UNTERSUCHUNGEN ZUR BILIPROTEIDKOMPOSITION UND - LOKALISATION IN ISOLIERTEN PHYCOBILISOMEN VON RHODELLA VIOLACEA

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

KLAUS-PETER KOLLER
aus Wanne-Eickel

Marburg/Lahn 1979

Druck: Mauersberger, Marburg

UNTERSUCHUNGEN ZUR BILIPROTEIDKOMPOSITION UND - LOKALISATION IN ISOLIERTEN PHYCOBILISOMEN VON RHODELLA VIOLACEA

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

KLAUS-PETER KOLLER

aus Wanne-Eickel

Marburg/Lahn 1979

Druck: Mauersberger, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität
Marburg/Lahn als
Dissertation angenommen am: 31.12.1978
Tag der mündlichen Prüfung: 12.1.1979
Berichterstatter : Prof. Dr. W. Wehrmeyer
Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Follmann

Für Sigrid, Kai und Peter

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546027_0072

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG 1

II. MATERIAL UND METHODEN 7

1. Reagenzien und Referenzproteine 7

2. Kulturbedingungen für Rhodella violacea 7

3. Präparative Darstellungen 9

3.1. Isolierung der Phycobilisomen 9

3.1.1. Normalverfahren 10

3.1.2. Schnellverfahren 10

3.2. Isolierung der Biliproteide 10

3.2.1. Dissoziation der Phycobilisomen 10

3.2.2. Phycoerythrine 11

3.2.3. Phycocyanin und Allophycocyanin 12

3.3. Isolierung der Dreiereinheiten 13

4. Analytische Verfahren 14

4.1. Spektraldaten 14

4.1.1. Absorptionsspektren und Extinktionsmessungen 14

4.1.2. Fluoreszenzemissionsspektren 14

4.1.3. Extinktionskoeffizienten 14

4.2. Messung der quantitativen Pigmentgehalte in Biliproteidgemischen 15

4.3. Aufnahme von Elutionsprofilen 16

4.4. Densitometrische Messungen 16

4.5. Molekulargewichte von nativen Biliproteiden und Biliproteidaggregaten 17

4.5.1. Sephadex G-200-Gelchromatographie 17

4.5.2. PAA-Gradientengel-Elektrophorese 17

4.6. Molekulargewichte der Biliproteiduntereinheiten, Analyse der Untereinheitenmuster 19

4.6.1. SDS-PAA-Flachgel-Elektrophorese 19

4.6.2. SDS-PAA-Gradientengel-Elektrophorese 20

4.6.3. Harnstoff-PAA-Gelelektrophorese 22

4.7. Homogenitätstest für die isolierten Biliproteide 22

4.7.1. PAA-Flachgel-Elektrophorese 22

4.7.2. Isoelektrische Fokussierung in PAA-Gelen 23

4.8. Isoelektrische Punkte 23

4.9. Quantitative Aminosäureanalyse 24

4.10. Cross-Linking Experimente 24

4.11. Elektronenmikroskopie 25

III. ERGEBNISSE 27

1. Isolierung der Phycobilisomen 28

2. Darstellung und biochemische Charakterisierung der Biliproteide 32

2.1. Isolationsverfahren, Homogenität und Reinheit der Biliproteide 32

2.2. Spektraldaten 37

2.3. Molekulargewichte der nativen Biliproteide 41

2.4. Untereinheitenanalyse 46

2.5. Isoelektrische Punkte 51

2.6. Quantitative Aminosäurezusammensetzung 52

3. Biochemische, funktionelle und strukturelle Charakterisierung isolierter intakter Phycobilisomen 55

3.1. Absorptionsspektren 55

3.2. Fluoreszenz und Energietransfer 57

3.3. Quantitativer Biliproteidgehalt 63

3.4. Variation der Biliproteidkomposition 64

3.5. Elektronenmikroskopische Darstellung 69

4. Biochemische und funktionelle Charakterisierung intakter Dreiereinheiten 71

4.1. Isolationsverfahren 71

4.2. Absorptionsspektren 73

4.3. Fluoreszenz und Energietransfer 73

4.4. Vergleich der Untereinheitenmuster von Dreiereinheiten und Phycobilisomen 76

4.5. Quantitative Pigmentzusammensetzung 76

4.6. Anordnung der Biliproteide in den Dreiereinheiten 78

4.7. Molekulargewicht 83

IV. DISKUSSION UND VORSTELLUNG EINES MODELLS DER ANORDNUNG VON B-PHYCOERYTHRIN, C-PHYCOCYANIN UND ALLOPHYCOCYANIN IN DEN PHYCOBILISOMEN 84

V. ZUSAMMENFASSUNG 97

VI. LITERATUR 100

Abkürzungen:

APC	Allophycocyanin
BIS	N', N' - Methylenbisacrylamid
DMAPN	Dimethylaminopropionitril
DMS	Dimethyl-Suberimidat
DTBP	Dithiobispropionimidat
E	Extinktion
EDTA	Äthylendinitrilotetraessigsäure
MG	Molekulargewicht
PAA	Polyacrylamid
PC	Phycocyanin
PE	Phycoerythrin
Phosphatpuffer	Na_2HPO_4-KH_2PO_4-Puffer
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethylendiamin
Tris	Tris (hydoxymethyl)-aminomethan
v	Volumen

I. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Die Nutzung von Sonnenenergie bei Photosyntheseprozessen in pflanzlichen Organismen ist an Lichtrezeptoren wie Chlorophylle, Xanthophylle und Carotine gebunden, die als integrale Bestandteile der Thylakoidmembranen eng mit den Reaktionszentren von Photosystem I und II assoziiert sind (Thornber, 1975; Süss et al., 1976). Rhodophyceen, Cryptophyceen und Cyanophyceen besitzen neben diesen primären Photosynthesepigmenten mit den Biliproteiden zusätzliche "akzessorische" Pigmente, die in der Grünlücke von Chlorophyll zwischen 500 und 650 nm absorbieren. Ihr Anteil am gesamten wasserlöslichen Protein einer Zelle kann bei der einzelligen marinen Rotalge Rhodella violacea nach Anzucht bei 800 Lux bis zu 63 % betragen. Die Werte für Cyanophyceen sind nur wenig niedriger (Bogorad, 1975).

In einem komplexen Energietransferprozess wird die von den Biliproteiden absorbierte Strahlungsenergie mit einem Wirkungsgrad von über 90 % auf Chlorophyll a übertragen und danach auf die beiden Photosysteme verteilt (Haxo, 1960; Larkum & Weihrauch, 1977; Ried et al., 1977; Ley & Butler, 1977; Porter et al., 1978). Der Besitz von Biliproteiden eröffnet den genannten Algengruppen vornehmlich ökologische Vorteile, indem lichtlimitierte Lebensräume wie tiefere Meeresregionen und Schattenzonen noch besiedelt werden können (Halldal, 1970; Glazer, 1977).

Die von O'h Eocha (1958) eingeführte Bezeichnung "Biliproteine" charakterisiert eine Klasse von Chromoproteiden, an deren Polypeptidketten lineare Tetrapyrrole (Biline) kovalent über Thioätherbrücken gebunden sind (Rüdiger, 1971; Chapman, 1973; Köst et al., 1975; Glazer, 1977). Die Art und Anzahl der Chromophore sowie deren Wechselwirkungen mit den umgebenden Aminosäuren bedingen die differierenden spektralen Eigenschaften der einzelnen Biliproteidtypen, die sich, mit Ausnahme von Phytochrom (Pratt, 1978), in drei Hauptgruppen einteilen lassen:

1. rote Phycoerythrine (E_{Max} 540 - 580 nm)
2. blaue Phycocyanine (E_{Max} 615 - 630 nm)
3. türkisfarbene Allophycocyanine (E_{Max} 650 - 670 nm)

(Haxo & O'h Eocha, 1960; Bogorad, 1975; Glazer & Bryant, 1975; Bryant et al., 1976; Glazer, 1977).

Die Biliproteide besitzen eine ausgeprägte Quartärstruktur. Sie sind in der Regel aus leichteren α- und schwereren ß-Untereinheiten aufgebaut (Bogorad, 1975). Für den B-Typ von Phycoerythrin wurde darüber hinaus eine zusätzliche γ-Untereinheit nachgewiesen (Glazer & Hixson, 1977). Durch die Aggregation einer α-Kette mit einer ß-Kette entstehen als basale Grundeinheiten Monomere (MG 30 000 - 45 000). Daraus bilden sich, wie besonders für den C-Typ des Phycocyanins nachgewiesen, häufig in Abhängigkeit vom pH-Wert, der Ionenstärke sowie u.a. der Biliproteidkonzentration stabile Trimere, Hexamere oder noch höhere Aggregationsformen (Hattori et al., 1965; MacColl et al., 1971a,b; Glazer, 1976; Gantt, 1969; Nolan & O'h Eocha, 1967).

Demgegenüber haben die Biliproteide der Cryptophyceen eine einheitliche, von dem oben genannten Schema abweichende Aggregationsstufe $(\alpha,\beta)_2$. Pro Algenspezies wurden nur Biliproteide eines Typs nachgewiesen, die intrathylakoidal angeordnet sind (MacColl et al., 1976; Mörschel & Wehrmeyer, 1977; Gantt et al., 1971; Lichtle, 1978).

Die Lokalisation der Biliproteide in Rhodophyceen und Cyanophyceen war lange umstritten. Erst 1966 konnten Gantt & Conti (1967) für Rotalgen den Nachweis erbringen, daß die Biliproteide weder in die Thylakoidmembranen eingebaut (Brody & Vatter, 1959) noch frei im Stroma verteilt sind (Giraud, 1963), sondern in spezifischen Aggregaten, den Phycobilisomen, mit den Thylakoidmembranen oberflächlich assoziiert auftreten. Die Organistionsform der Phycobilisomen ist inzwischen auch für Cyanophyceen verbindlich belegt (Gray et al., 1973; Wildman & Bowen, 1974).

Die eindeutige Aussage über die Lokalisation der Biliproteide in der Zelle gelang erst nach Entwicklung entsprechneder Isolationsverfah-

ren für Phycobilisomen. Solche liegen für die Phycobilisomen der Rotalge Porphyridium cruentum sowie der Cyanophycee Nostoc sp. vor (Gantt & Lipschultz, 1972; Gray et al., 1973). Angesichts der im Thema gestellten Frage war daher das erste Ziel der Arbeit die Entwicklung eines geeigneten Isolationsverfahrens für die Phycobilisomen von Rhodella violacea.

Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen lassen sich morphologisch zwei Phycobilisomentypen unterscheiden, solche von sphärisch-länglicher und die von scheibchenförmiger Gestalt. Der erste Typ mit einem Durchmesser von 30 - 40 nm und einer Dicke von 20 - 30 nm wurde in Porphyridium cruentum sowie höher organisierten Rotalgen nachgewiesen (Gantt & Conti, 1967; Lichtle, 1978). Scheibchenförmige Phycobilisomen sind weniger als halb so dick und wurden bei der Rotalge Porphyridium aerugineum sowie bei allen bislang untersuchten Cyanophyceen gefunden (Gantt et al., 1968; Wildman & Bowen, 1974). Auf Grund vergleichend morphologischer und pigmentanalytischer Untersuchungen an den beiden Porphyridium-Arten postulierten Gantt & Conti (1967) sowie Gantt (1975) einen Zusammenhang zwischen der Phycobilisomengestalt und dem Biliproteidgehalt. Bei dominierendem Phycoerythringehalt sollten die Phycobilisomen sphärisch, bei überwiegendem Phycocyaningehalt scheibchenförmig sein.

Obgleich in wässrigen Rohextrakten der Rotalge Rhodella violacea B-Phycoerythrin, C-Phycocyanin und Allophycocyanin nachgewiesen werden konnten (Koller & Wehrmeyer, 1974; 1975), liegen in den Plastiden dieser Alge scheibchenförmige Phycobilisomen mit einem Durchmesser von 36 - 40 nm und einer Dicke von 6.5 - 7 nm vor, wie elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten eindeutig belegen (Abb. 1 sowie Modell der räumlichen Verteilung der Phycobilisomen in Abb. 2; vgl. auch Wehrmeyer, 1971; Wehrmeyer & Schneider, 1975). Bei dieser Sachlage galt es, die qualitative Pigmentanalyse um die quantitative Biliproteidbestimmung auf der Grundlage isolierter Phycobilisomen auszubauen.

Die sich hier anschließende, weiterführende Zielsetzung konnte nur

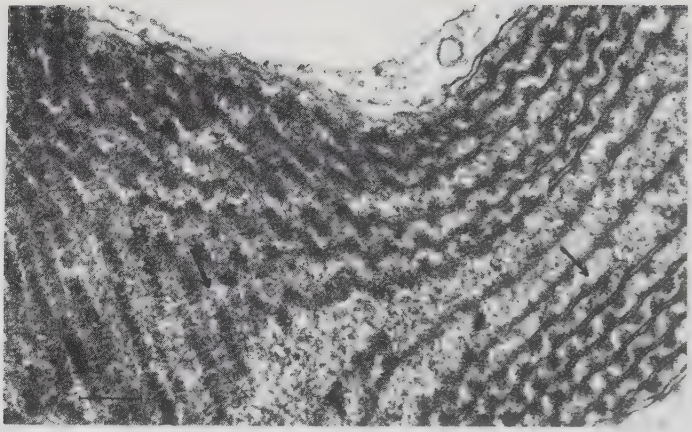

Abb. 1: Ausschnitt aus der Plastide von Rhodella violacea. Thylakoide mit scheibchenförmigen Phycobilisomen a. in Frontansicht (⟶) bei Schnitten senkrecht zu den Thylakoiden und b. in Aufsicht (⟹) bei Schnittführung parallel zu den Thylakoiden. Maßstab: 150 nm.

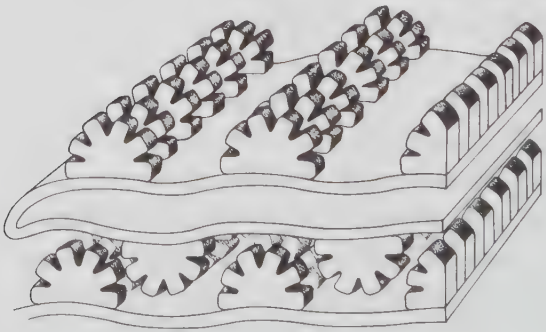

Abb. 2: Räumliches Modell der Anordnung der Phycobilisomen auf den Thylakoiden.

darin bestehen, die an isolierten Phycobilisomen gewonnenen pigmentanalytischen Daten mit den feinstrukturellen Befunden an Phycobilsomen in situ und in vitro zu kombinieren und damit von der Frage der Pigmentkomposition zur Frage der Pigmentlokalisation vorzustoßen. Durch Hochauflösungselektronenmikroskopie an isolierten Phycobilisomen von Rhodella violacea gelang es vor kurzem, die grundsätzliche molekulare Ordnung der Biliproteidaggregate innerhalb der Phycobilisomne aufzuklären (Mörschel et al., 1977). Hierbei waren die Scheibchennatur der untersuchten Phycobilisomen, die damit verbundene flächenhafte Adsorption an dem Unterstützungsfilm der Objektträger und die dadurch bedingte Durchstrahlbarkeit der Präparate vorteilhafte Voraussetzungen. In den sphärischen Phycobilisomen von Porphyridium cruentum dagegen überlagern sich bis zu 80 Einzelaggregate mit Molekulargewichten bis zu 280 000 in schwer analysierbaren Präparaten (Gantt et al., 1976). Voraussetzung für die bei Rhodella-Phycobilisomen möglich erscheinende Klärung der Biliproteidlokalisation war die pigmentanalytische Charakterisierung einer definierten Strukturkomponente des Phycobilisoms (Dreiereinheit), für die ein entsprechendes Isolationsverfahren entwickelt werden mußte.

Die über die feinstrukturelle Ordnung und Biliproteidlokalisation innerhalb der Phycobilisomen hinausführende Fragestellung bezieht sich auf die funktionelle Leistung. Die Aggregation der Biliproteide in den Phycobilisomen bedingt eine enge räumliche Beziehung zueinander. Da sich zusätzlich die Absorptions- und Fluoreszenzspektren überlappen, wird in den Phycobilisomen von Porphyridium cruentum funktionell ein intermolekularer Tranfer von Anregungsenergie in einer Sequenz vom Phycoerythrin über Phycocyanin auf Allophycocyanin ermöglicht, wobei sich die Rotfluoreszenz von Allophycocyanin in vitro mit der Absorption von Chlorophyll a in vivo weitgehend überlagert (Gantt & Lipschultz, 1973; Grabowski & Gantt, 1978; Searle et al., 1978). Die Fähigkeit zum intermolekularen Energietransfer geht irreversibel bei der Dissoziation der Phycobilisomen verloren (Gantt & Lipschultz, 1973). Für die Phycobilisomen von Rhodella sollte nun gezeigt werden, ob

eine Beziehung zwischen der Sequenz der Biliproteidanordnung und der Richtung des Energietransfers besteht.

Ausgehend von der Sequenz des Energietransfers sowie von Dissoziationsstudien und immunologischen Experimenten entwickelten Gantt und Mitarbeiter (1976; 1977) ein Modell einer gerichteten Biliproteidanordnung in den sphärischen Phycobilisomen von Porphyridium cruentum. Das Phycoerythrin sollte demnach peripher, das Phycocyanin median und das Allophycocyanin an der den Thylakoiden zugewandten Seite lokalisiert sein. Ein weitergehender Beleg für diese Annahme durch die direkte Zuordnung einzelner Biliproteide zu elektronenmikroskopisch sichtbaren Strukturen oder die Isolierung und funktionelle Charakterisierung heterogener Biliproteidaggregate z.B. aus Phycoerythrin und Phycocyanin fehlt bislang. In diesem Zusammenhang bestand das letzte Ziel der Arbeit darin, für den scheibchenförmigen Phycobilisomentyp von Rhodella ein Modell für die Lokalisation aller Biliproteide zu entwickeln, das den Kriterien des qualitativen und quantitativen Biliproteidgehalts, der Funktion und der feinstrukturellen Ordnung genügt.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Reagenzien und Referenzproteine

Sofern nicht anders angegeben, wurden in der Arbeit Feinchemikalien p.a. oder bester lieferbarer Qualität der Fa. Merck (Darmstadt) verwendet.

Triton X 100 (pract.), Ammoniumpersulfat, DMAPN, TEMED, Coomassie Blau G 250, Amidoschwarz 10 B, DMS, Glutaraldehyd, Jodacetamid sowie Servalyt (40 %) pH 4-6 und 6-8 waren von Serva (Heidelberg),
Nonidet P 40 von BdH Chemicals (Poole, England),
SDS (seq. grade) von Pierce (Rockford, USA),
Agepon von Agfa (Leverkusen),
DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-25 fine, G-50 fine, G-200 fine sowie Dextranblau 2000 von Pharmacia (Heidelberg).
Thyroglobulin vom Schwein (Typ II) und Katalase aus Rinderleber (2 x krist.) wurden geliefert von Sigma (München),
Ferritin und Aldolase aus Kaninchenmuskel (Combithek) von Boehringer (Mannheim),
Hühnereialbumin, Chymotrypsinogen A aus Rinderpankreas und Lysozym aus Hühnereiweiß (alle reinst) von Serva (Heidelberg),
Rinderserumalbumin (reinst) von den Behringwerken (Marburg).

DTBP war ein Geschenk von Herrn Dipl. Chem. N. Koch, Abt. f. Experimentelle Immunologie, FB Humanmedizin, Universität Marburg.

2. Kulturbedingungen für Rhodella violacea

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden Nachzuchten der bangialen Rotalge Rhodella violacea (Kornmann) comb. nov. verwendet (Wehrmeyer, 1971). Die Originalkulturen dieser einzelligen marinen Alge stammen von Prof. Kornmann, Helgoland.

Die für die Pigmentisolierung unumgängliche Massenanzucht der Algen erfolgte bei 18 - 20°C als Durchströmungskultur in einem Lichtthermostaten

nach Kuhl und Lorenzen (1964). Als Nährmedium diente das für Porphyridium cruentum entwickelte künstliche Seewassermedium nach Jones, Speer und Kury (1963), das wie folgt modifiziert wurde:

1. Das Medium wurde vor dem Autoklavieren durch Zufügen von 20 ml/l einer 1 M Tris HCL-Lösung auf einen definierten pH-Wert von 7.2 eingestellt.
2. Der Eisenanteil des Mediums wurde durch Zufügen von 1 ml/l einer Eisenkomplexlösung erhöht, bei der in 100 ml einer 50 mM Na_2-EDTA-Lösung 240 mg $FeCl_3 \times 4\ H_2O$ enthalten sind.
3. Zusätzlich wurden dem Medium nach dem Autoklavieren 1.28×10^{-2} mM/l Vitamin B_1, 2.76×10^{-4} mM/l Vitamin B_{12} und 1.24×10^{-2} mM/l Biotin zugefügt. Durch die Abwandlung des Originalmediums konnte sowohl eine Steigerung der Wachstumsraten wie eine Reduktion der Stärke- und Schleimbildung erzielt werden.

Als Inoculum für die mit je 250 ml Kulturmedium gefüllten Kulturröhren (3.7 x 42 cm) diente jeweils 10 ml einer 14 Tage alten, am Beginn der stationären Phase befindlichen Algensuspension einer Massenkultur. Die Kulturen wurden mit 1 000 Lux, in Ausnahmen zur Variation des Pigmentgehaltes mit 3000 Lux weißen Mischlichts in einem Licht/Dunkelwechsel von 16:8 Stunden bestrahlt. Die Beleuchtungsstärke wurde an der Vorderseite der Kulturbecken gemessen. Um die spektrale Energieverteilung der verwendeten Leuchtstofflampen ausreichend dem Absorptionsbereich der Algen anzupassen, wurden 3 Leuchtstofflampen der Fa. Osram vom Typ Tageslicht L 40 W/15-1, Universalweiß L 40 W/25-1 und Warmton de Lux L 40 W/32-1 zusammengeschaltet. Der Gasdurchsatz pro Kulturröhre betrug ca. 15 l/Std. bei einer Zusammensetzung von 2-4 % CO_2 in Luft.

Für die Isolierung der Phycobilisomen wurden 14 Tage alte Kulturen mit einer durchschnittlichen Zellzahl von $2.5\text{-}3 \times 10^6$ Zellen/ml verwendet.

Zur Induktion des Nitratmangels wurden Zellen aus 14 Tage alten Normalkulturen in nitratfreies Nährmedium übertragen, in dem KNO_3

durch eine äquimolare Menge von KCl ersetzt worden war (Wehrmeyer & Schneider, 1975). Vor dem Überimpfen wurden die Zellen zweimal in nitratfreiem Medium gewaschen. Die Anfangszellzahl in den angeimpften Kulturen betrug 1 x 10^6 Zellen/ml. Phycobilisomen wurden aus 6 Tage alten Mangelkulturen isoliert. Die Kulturen befanden sich zu diesem Zeitpunkt am Beginn der stationären Phase, der Biliproteidgehalt pro Zelle war auf 30 % reduziert. Die übrigen Kulturbedingungen entsprachen denen der Normalkultur.

3. Präparative Darstellungen

Alle Puffer und Lösungen, die für die Isolierung der Phycobilisomen, der Dreiereinheiten, der einzelnen Biliproteide sowie zur Herstellung der Dissoziate verwendet wurden, enthielten 1 mM ß-Mercaptoäthanol, um Oxidationen durch gelösten Luftsauerstoff zu vermeiden.

3.1. Isolierung der Phycobilisomen

Die Zellen von 250 ml Zellsuspension wurden durch Zentrifugation (1 100 g, 7 min.) in der UJ III-Zentrifuge (Christ, Osterode) abgeerntet und zweimal mit je 150 ml 0.65 M Phosphatpuffer pH 7.0 gewaschen. 3 - 4 g Algen (Naßgewicht) wurden in einen Stahlbecher eingewogen und mit 12 ml Phosphatpuffer gut vermischt. Der Aufschluß der Algen erfolgte durch Ultraschall mit einem Branson Sonifier, Modell 125 (Beschalldauer 5 x 30 sek., 2 x Energiestufe 4, 3 x Energiestufe 5). Während des Aufschlusses wurde der Stahlbecher in einem Wasserbad bei 8 - 10° C gekühlt. 12 ml des Zellhomogenats wurden mit 0.5 - 1 % Triton X 100 bzw. Nonidet P 40 für 15 min. unter ständigem Rühren (Magnetrührer) bei Zimmertemperatur inkubiert. Zur Entfernung von nicht aufgeschlossenen Zellen, Zellbruchstücken sowie Stärke wurde die Suspension bei 42 000 x g für 15 min. bei 15°C zentrifugiert (J 21-B, Beckman Instruments, München). Die durch Einwirkung des Detergens von den Thylakoidmembranen abgelösten Phycobilisomen verbleiben im Überstand, von dem je 1.5 - 2.5 ml/Zentrifugenröhrchen auf die kontinuierlichen

Gradienten zur Ultrazentrifugation geschichtet wurden.

Für die präparative Darstellung der Phycobilisomen durch Ultrazentrifugation wurden zwei Verfahren entwickelt, die sich durch Änderung der Steilheit des Gradienten wesentlich in der Zentrifugationsdauer unterscheiden.

3.1.1. Normalverfahren

Dichtegradient: Kontinuierlich, 0.2 - 0.75 M Saccharose in 0.65 M Phosphatpuffer pH 7.0, 32 ml Zentrifugenröhrchen. Zentrifugationsbedingungen: 120 000 x g, 15 Std., 14° C. (SW 27 Rotor, Spinco L 2-65-B, Beckman Instruments, München).

3.1.2. Schnellverfahren

Dichtegradient: Kontinuierlich, 0.2 - 0.45 M Saccharose in 0.65 M Phosphatpuffer pH 7.0, 18.5 ml/Zentrifugenröhrchen. Nach Probenaufgabe werden die Röhrchen mit ca. 12 - 15 ml Paraffinöl aufgefüllt, um ein Kollabieren zu vermeiden. Zentrifugationsdauer: 3 - 3.5 Std. bei 120 000 g, 14° C. Rotor und Zentrifuge wie oben.

Die getrennten Biliproteidbanden wurden durch eine 20 µl Einmalpipette Typ Sahli (Brand, Wertheim) über eine Varioperpex-Pumpe (Durchfluß 4,5 ml/min.) aus dem Röhrchen herausgesaugt, die Phycobilisomenfraktionen kombiniert und anschließend durch Amicon-Ultrafiltration (XM 50-Filter) angereichert. Alternativ wurden die Phycobilisomenfraktionen zweifach mit 0.65 M Puffer verdünnt und durch Zentrifugation für 1.5 Std. bei 310 000 x g ankonzentriert (Typ 65-Rotor, Ultrazentrifuge wie oben). Das lockere Sediment wurde dann mit einer Pipette entnommen. Die isolierten Phycobilisomen sind als dichte Lösung nach Zugabe von 0.02 % Natriumazid im Dunkeln bei 14°C für mindestens 1 Monat intakt lagerfähig.

3.2. Isolierung der Biliproteide

3.2.1. Dissoziation der Phycobilisomen

Phycobilisomen dissoziieren nach Reduktion der Puffermolarität (Gantt & Lipschultz, 1973). Um die übermäßige Verdünnung der Proben,

die bei den bislang zur Dissoziation verwendeten Dialyseverfahren auftritt (Gantt & Lipschultz, 1974; Gray & Gantt, 1975), zu vermeiden, wurden Präparationen hier an einer Sephadex G-25-Fine-Säule entsalzt (4 x 25 cm, Probevolumen 25 - 30 ml, Eluant: Destilliertes Wasser). Die biliproteidhaltigen Fraktionen wurden mit Hilfe eines zuvor geeichten Leitfähigkeitsmeßgerätes auf 3 mM mit 0.65 M Phosphatpuffer pH 7.0 eingestellt und unter leichtem Rühren (Magnetrührer) für 12 Std. (zur Präparation der Dreiereinheiten), ansonsten bis zu 2 Tagen (zur Isolierung der einzelnen Biliproteide) bei 4°C in der Kühlkammer aufbewahrt. Die partiell dissoziierten Phycobilisomen wurden durch Amicon-Ultrafiltration (PM 30-Filter) zur weiteren Verwendung ankonzentriert.

3.2.2. Phycoerythrine

Aus den dissoziierten Phycobilisomen wurde unter Ausnutzung der Molekulargewichtsunterschiede der einzelnen Biliproteide durch präparative Ultrazentrifugation zunächst eine phycoerythrin- und eine phycocyanin-allophycocyaninreiche Fraktion gewonnen.

Dichtegradient: Kontinuierlich, 0.2 - 0.55 M Saccharose in 3 mM Phosphatpuffer pH 7.5, 23.5 ml/Zentrifugenröhrchen. Zentrifugationsbedingungen: 113 000 x g, 15 Std., T = 5 - 10°C. Die Proben wurden mit Saccharose auf eine Endkonzentration von 0.125 M eingestellt, je 3 ml (6-8 mg Gesamtbiliproteidgehalt) auf die Gradienten geschichtet und anschließend die Röhrchen mit einer Lösung von 75 mM Saccharose in Phosphatpuffer aufgefüllt. Die Anreicherung der separierten Biliproteidfraktionen erfolgte durch Amicon-Ultrafiltration (PM 30 Filter).

Die endgültige Trennung und Reinigung der Phycoerythrine nach der Dichtegradientenzentrifugation erfolgte durch präparative Gelelektrophorese und Re-Elektrophorese der isolierten Phycoerythrin-Modifikationen in 16 mm dicken Plattengelen unter Verwendung einer auf 4° C gekühlten Flachgel-Elektrophoreseapparatur nach Stegemann (1972) sowie methodischen Hinweisen von Stegemann et al. (1973) und Koller & Wehrmeyer (1975).

Für den ersten Reinigungsschritt wurde ein 5 % Gel (Acrylamid: Bis=19:1) sowie ein Tris-Borsäure-Puffersystem pH 8.9, 0.125 M verwendet. Nach Vorelektrophorese (30 mA/Gel, 6 Std.) wurden 3 - 5 ml der angereicherten Phycoerythrin-Fraktion aus den Dichtegradienten (10 - 15 mg Phycoerythrin) appliziert. In der Hauptelektrophorese trennen sich innerhalb von 14 Std. bei 30 - 40 mA/Gel zwei Phycoerythrin-Modifikationen auf mit Wanderungsstrecken von 9 bzw. 11 cm. Die Isoproteide wurden aus dem Gel eluiert, angereichert und einer zweiten Elektrophorese unter geänderten Pufferbedingungen unterworfen (Koller & Wehrmeyer, 1975). Elektrophoresepuffer: 30 mM Tris-Borsäure, pH 7.9. Elektrophoresebedingungen und Gel siehe oben. Nach Isolation der einzelnen Phycoerythrine wurden die Pigmente durch Zugabe von 0.25 g $(NH_4)_2SO_4$ pro ml gefällt und für die weiteren Untersuchungen nach einer Anreicherungszentrifugation entweder gegen Puffer oder destilliertes Wasser dialysiert.

3.2.3. Phycocyanin und Allophycocyanin

Nach 15-stündiger Dialyse gegen 30 mM Phosphatpuffer pH 7.0 mit 0.15 M NaCl wurden zunächst Phycocyanin und Allophycocyanin, die nach dem Ultrazentrifugationsschritt in einem Gemisch vorlagen, durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex A-50 bei 4° C voneinander getrennt (Koller & Wehrmeyer, 1974).

Chromatographiebedingungen: Säulenfüllung: 4 x 25 cm. Probevolumen: 8 - 10 ml (8 mg PC + 4 mg APC). Äquilibrierung mit o.a. Dialysepuffer bei konstantem Durchfluß von 18 ml/Std.. Entwicklung: ansteigender, linearer NaCl-Gradient von 0.15 - 0.45 M in 30 mM Phosphatpuffer pH 7.0, hergestellt mit Hilfe eines Ultrograd-Gradientenmischers (LKB Instruments, Gräfelfing). Zeiteinstellung: 2 Tage. Die Eluatkontrolle erfolgte routinemäßig über einen Uvicord II (LKB Instruments) bei 280 nm, ansonsten durch Messung der Extinktion der mit einem UltroRac (LKB Instruments) gesammelten Einzelfraktionen von 13.5 ml bei den Wellenlängen 278, 542, 618 und 652 nm. Die Phycocyanin bzw. Allophycocyanin enthaltenden Eluate wurden durch Amicon Ultrafiltration (PM 30 Filter)

angereichert und gegen 1 % Glycin für 15 Std. dialysiert. Zur Vermeidung unspezifischer Adsorption empfiehlt es sich, die Ultrafilter zuvor durch Filtration mit einer 0.1 %-igen Rinderserumalbuminlösung abzusättigen.

Die Reindarstellung von Phycocyanin und Allophycocyanin erfolgte durch isoelektrische Fokussierung in granulierten Gelen unter Verwendung einer LKB 2117 - Multiphor-Elektrophoreseapparatur (Winter et al., 1975; Radola, 1974).

Gel: 4 % Ultrodex (vor Abdampfen) mit 1.2 % Servalyt pH 4 - 6, 1 mM ß-Mercaptoäthanol. Probe: 5 - 8 mg Biliproteid in 3 ml einer 1 % Glycin-Lösung. Anodenpuffer: 0.1 M Glutaminsäure in 0.5 M H_3PO_4. Kathodenpuffer: 0.1 M ß-Alanin in 0.4 % Servalyt pH 6 - 8. Fokussierung: 400 V für 14 - 16 Std., dann 800 V für 2 - 4 Std. bei 10° C.

Die fokussierten Proteide wurden mit einem Spatel in Eluiersäulchen überführt (2 ml Henke-Spritze, an deren Boden als Support Monodur-Filtergewebe mit einer Maschenweite von 31.5 µm mit einem O-Ring festgeklemmt war). Die Elution der Proteide erfolgte mit 65 mM Phosphatpuffer pH 7.0. Zur Entfernung der Ampholyte wurden die Proben entweder dialysiert oder an einer Sephadex G-50 Säule (1.5 x 30 cm) chromatographiert. Dialyse- bzw. Eluiermedium: 30 mM Phosphatpuffer oder destilliertes Wasser.

3.3. Isolierung der Dreiereinheiten

Dreiereinheiten wurden aus Suspensionen dissoziierter Phycobilisomen (Kap. II. 3.2.1.) durch präparative Ultrazentrifugation aufgetrennt.

Dichtegradient: Kontinuierlich, 0.15 - 0.35 M Saccharose in 0.65 M Phosphatpuffer pH 7.0; 20 ml pro Zentrifugenröhrchen. Zentrifugationsbedingungen: 113 000 x g, 14 Std. bei 14° C. Probevolumen: 2 ml (4 - 6 mg Gesamt-Biliproteidgehalt) pro Röhrchen. Die aufgetrennten Banden wurden nach dem Anstechen der Röhrchen eluiert und fraktioniert (siehe Kap. II. 4.3).

4. Analytische Verfahren

4.1. Spektraldaten

4.1.1. Absorptionsspektren und Extinktionsmessungen

Die Absorptionsspektren wurden in Quarzküvetten bei Zimmertemperatur mit einem Zweistrahl-Spektrophotometer DMR 10 der Fa. Zeiss (Oberkochen) aufgenommen, das mit einem Digitalaufsatz ausgestattet war. Die Extinktionsmessungen bei definierten Wellenlängen erfolgten in Quarzküvetten im Spektralphotometer PMQ II der Fa. Zeiss. Die Schichtdicke betrug 1 cm, bei stark verdünnten Lösungen 2 cm.

4.1.2. Fluoreszenzemissionsspektren

Zur Messung der Fluoreszenzspektren in Quarzküvetten (d=0.2 cm) stand ein Front-Surface Fluorometer zur Verfügung (Fachbereich Physikal. Chemie, Universität Marburg). Lichtquelle: HBO 200 W-2 Quecksilberdampflampe (Osram, Hamburg); Anregungs- und Analysatormonochromator: Bausch und Lomb, Modell 33-68-40, Dispersion 6.6 nm pro mm, blazed bei 300 bzw. 500 nm. Photomultiplier: EMI Typ 9659 B, ausgestattet mit einer "Extended" S-20 Kathode. Für die Messung wurde der Multiplier, der in einem Spektralbereich von 350 - 900 nm ausreichend empfindlich ist, zur Unterdrückung des Dunkelrauschens auf -25° C vorgekühlt. Verstärkung: Brookdeal-Look-In-Amplyfier, Modell 401, Bracknell, England). Die Bandbreite am Anregungsmonochromator betrug 5 nm, die am Analysator 1.5 nm. Biliproteidkonzentration: 0.1 - 0.3 mg/ml (E_{max} = 0.5 - 1.5). Anregung: 546 nm für die gereinigten Biliproteide, Dreiereinheiten und dissoziiertes Material, 546 und 435 nm für intakte Phycobilisomen. Die Fluoreszenzspektren wurden auf die spektrale Empfindlichkeit des Photomultipliers hin per Hand korrigiert und normiert.

4.1.3. Extinktionskoeffizienten

Die Extinktionskoeffizienten ε (ml/mg, d=1 cm) lassen sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz aus Proben definierter Extinktion im Absorptionsmaximum sowie bekannten Proteingehalts nach folgender

Gleichung berechnen:

$$\varepsilon = \frac{E}{C} \text{ (für d=1cm)}$$

Bei der Abschätzung des Proteingehalts wurde die von Urbach et al. (1972) modifizierte Methode nach Lowry et al. (1951) mit Rinderserumalbumin als Standard angewendet. Um bei der Proteinbestimmung Verfälschungen der Meßwerte auf Grund der Eigenabsorption der Biliproteidchromophore im Bereich 550 nm auszuschließen, wurden die Extinktionsmessungen bei 750 nm durchgeführt. Alle Proben (E_{max} = 0.5 - 2.0) waren in 30 mM Phosphatpuffer pH 7.0 gelöst.

4.2. Messung der quantitativen Pigmentgehalte in Biliproteidgemischen

Um den quantitativen Gehalt der einzelnen Biliproteide in einem Gemisch zu ermitteln, wie es in den Phycobilisomen bzw. Rohextrakten vorliegt, wurden unter Berücksichtigung der Extinktionskoeffizienten der gereinigten Biliproteide und der Überlappung der Absorptionsspektren von Phycoerythrin, Phycocyanin und Allophycocyanin in den jeweiligen Maxima folgende Gleichungen für die Konzentration der individuellen Pigmente errechnet:

$$C_{PE} = (E_{542} - 0.185\ E_{618} + 0.016\ E_{652}) / 5.58$$

$$C_{PC} = (E_{618} - 0.652\ E_{652}) / 5.51$$

$$C_{APC} = (E_{652} - 0.086\ E_{618}) / 5.74$$

Da die beiden Phycoerythrin-Modifikationen sich spektralphotometrisch in einem Gemisch beider Komponenten nicht differenzieren lassen, wurde für die Bestimmung des Gesamtgehaltes an Phycoerythrin ein mittlerer Wert von 5.58 als Extinktionskoeffizient zu Grunde gelegt. Die Extinktionswerte bei 542, 618 und 652 nm wurden von Lösungen dissoziierter Phycobilisomen und Rohextrakten ($E_{542\ nm}$ = 0.75 - 1.5) ermittelt, die 12 Std. gegen 30 mM Phosphatpuffer pH 7 dialysiert worden waren.

4.3. Aufnahme von Elutionsprofilen

Um die Position und Anzahl der Proteinbanden in den Dichtegradienten zu erfassen, wurden nach erfolgter Trennung Elutionsprofile aufgenommen. Mit einer Sterikan R I Kanüle (0.9 x 38 mm, Braun, Melsungen), die mittels eines Distanzstückes reproduzierbare Einstichtiefen gewährleistete, wurde das Röhrchen ca. 3 mm tief angestochen und bei konstantem Ausfluß von 64 ml/Std. entleert. Eluatkontrolle: Uvicord II bei 280 nm, 1.5-fache Spreizung, Durchflußküvette 0.7 mm i.D.. Aufzeichnung: Servogor-Kompensationsschreiber PE 541 (Metrawatt, Nürnberg), Empfindlichkeit 100 mV, Schreibervorschub 600 mm/Std. Um eine Verwirbelung des Gradienten bei der Elution zu vermeiden, muß der Durchfluß durch die Meßzelle von oben nach unten erfolgen.

4.4. Densitometrische Messungen

Um die Anteile einzelner Biliproteide und Biliproteid-Untereinheiten nach Trennung in PAA-Gelen quantitativ zu erfassen, wurden die Proteinbanden entweder ungefärbt im jeweiligen Absorptionsmaximum oder nach Anfärbung mit Amidoschwarz bei 620 nm mit Hilfe eines Scanning-Zusatzes zum PMQ II densitometrisch vermessen (Koch, 1968). Die Registrierung der Extinktionskurven erfolgte über einen Servogor-Kompensationsschreiber. Bei der Auswertung wurde von äquivalenten Färbeeigenschaften der Proteine nach Anfärbung mit Amidoschwarz ausgegangen (Maurer, 1971). In diesem Fall sind die Flächen unter den Extinktionskurven relativ zur Basislinie proportional den Proteinquantitäten. Die Größe der Flächen wurde planimetrisch ermittelt (Haff-Planimeter, Typ 315). Alternativ wurden die Flächen unter den Peaks aus dem Schreiberpapier herausgeschnitten und das Papier gewogen. Das Gewicht ist hierbei proportional der Proteinmenge.

4.5. Molekulargewichte von nativen Biliproteiden und Biliproteidaggregaten

4.5.1. Sephadex G-200-Gelchromatographie

Die Abschätzung der Molekulargewichte der isolierten Biliproteide durch Gelchromatographie an Sephadex G-200 basierte auf methodischen Hinweisen von Andrews (1964, 1965) und Determann (1967). Säulenfüllung: 1 x 80 cm. Durchfluß: konstant 4.5 ml/Std. Elutionspuffer: 30 mM Phosphatpuffer pH 7.0, 0.02 % NaN_3. Eluatkontrolle über Uvicord II bei 280 nm sowie Messung der Extinktionswerte in den Einzelfraktionen (1.5 ml) bei 278 nm, 542 nm, 618 nm und 652 nm. Probevolumen: 1 ml. Proteingehalt: 0.1 - 0.5 mg/ml. Referenzproteine (1 mg/ml): Ferritin (MG 450 000), Katalase aus Rinderleber (MG 240 000), Aldolase aus Kaninchenmuskel (MG 147 000) und Rinderserumalbumin (MG 67 000). Das Ausschlußvolumen V_0 wurde mit Dextranblau 2000 bestimmt.

4.5.2. PAA-Gradientengel-Elektrophorese

Die Molekulargewichte der isolierten Einzelpigmente sowie der mit Glutaraldehyd stabilisierten Biliproteidaggregate wurden ermittelt nach Elektrophorese in Gradientengelen (modifiziert, nach Lorentz, 1976) durch Vergleich der Wanderungsstrecken der Proben mit denen von Referenzproteinen definierten Molekulargewichts. Die Wanderungsstrecken in cm sind dabei proportional dem Logarithmus des Molekulargewichts.

Gellösung A: 26.3 % Monomer (Acrylamid : Bis = 34.7 : 1) in 85 mM Tris-Borsäure-Puffer pH 7.85, 0.36 mM Kaliumhexacyanoferrat (III). Die Polymerisation erfolgte durch Zugabe von 0.1 % (v/v) TEMED und 2.25 mM Ammoniumpersulfat.

Gellösung B: 3.5 % Monomer (Acrylamid : Bis = 34.7 : 1) in 85 mM Tris-Borsäurepuffer pH 7.85, 0.2 % Kaliumhexacyanoferrat (III). Polymerisation durch Zugabe von 0.1 % (v/v) TEMED und 5.25 mM Ammoniumpersulfat.

Herstellung der Gradientengele:
Die verwendeten Glasröhrchen (i.D. 5 mm, Länge 9.5 cm) wurden zunächst mehrfach in eine Agepon-Detergenzlösung (1:30 verdünnt) getaucht und bei 100° C getrocknet (Coating), danach einseitig mit Gummikappen (Bender & Hobein, Karlsruhe) verschlossen und auf dem Drehgestell befestigt. Nach Entgasen wurden jeweils 0.8 ml der Gellösung A mit einer Enzymtestpipette einpipettiert, durch Klopfen die Luftblasen vollständig entfernt und jeweils 0.8 ml der Gellösung B ohne Verwirbelung der Grenzschicht überschichtet. Zur Präparation der Gradienten wurden die anschließend auf dem Drehmotor senkrecht montierten Röhrchen für 1 Min. auf den Rotationswinkel von 3° gekippt und dann 7 Min. bei gleichem Winkel in Rotation versetzt (Antriebsaggregat: Rührmotor 11360, Heidolph, Kehlheim, 50 U/min.) Zur Stabilisierung der Gradienten wurde die Rotation für weitere 3 Min. bei senkrechter Stellung fortgeführt. Nach Überschichtung mit Isobutanol wurden die Röhrchen für die Dauer der Polymerisation (3/4 Std.) ca. 1 cm tief senkrecht in ein gerührtes Wasserbad (20° C) getaucht. Elektrophoresebedingungen: 0.4 mA, 4 V pro Gel für 2 Std., 0.5 mA für weitere 22 Stunden. Die Elektrophoresen wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt.

Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde den Proben, die 10 - 40 µg Protein in 30 - 50 µl 20 mM Tris-Borsäurepuffer pH 7.85 bzw. 30 mM Phosphatpuffer pH 7.0 enthielten, jeweils 10 µl einer Lösung von Eichproteinen sowie Saccharose bis zu einer Endkonzentration von 10 % zugegeben. Um scharfe Startzonen zu erzielen, sollte die Molarität des Puffers in der so erhaltenen Probelösung 1/4 - 1/5 niedriger sein als die Molarität des Gelpuffers (Hjerten et al., 1965). Die Eichproteinlösung war wie folgt zusammengesetzt: Thyroglobulin (0.8 mg/ml), Ferritin (1 mg/ml), Katalase (1.4 mg/ml) Rinderserumalbumin (1.6 mg/ml).

Nach dem Zerschlagen der Glasröhrchen (Maizel, 1971) wurden die Gele standardmäßig zur raschen Auswertung nach Reisner et al. (1975)

gefärbt oder aber für 1.5 Stunden bei Zimmertemperatur in einer Lösung von 0.5 % Amidoschwarz 10 B, 50 % Methanol und 10 % Eisessig (verändert, nach Maurer 1971). Die Amidoschwarz gefärbten Gele wurden durch Diffusion bei ständiger Bewegung auf einer Wiegewippe und durch mehrmaliges Wechseln der Entfärbelösung (10 % Essigsäure, 20 % Methanol) entfärbt. Die mit der Quellung verbundene Längenzunahme der Gele hatte keinen Einfluß auf die Molekulargewichtsbestimmung.

4.6. Molekulargewichte der Biliproteid-Untereinheiten, Analyse der Untereinheitenmuster

4.6.1. SDS-PAA-Flachgel-Elektrophorese

Die Molekulargewichte der Biliproteiduntereinheiten wurden ermittelt nach PAA-Flachgelelektrophorese in Gegenwart von 0.1 % Natriumdodecylsulfat durch Vergleich der Laufstrecken von Probe- und Referenzproteinen bekannten Molekulargewichts (Koenig et al., 1970 ; Weber et al., 1972). Die Elektrophorese in 3 mm dicken Gelen wurde bei 4° C unter Verwendung der Flachgelelektrophoreseapparatur und von methodischen Hinweisen von Stegemann et al. (1973) durchgeführt. Gellösung: 5 % Monomer (Acrylamid : Bis = 19 : 1) in 25 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.1 mit 0.1 % SDS. Polymerisation bei 4° durch Zugabe von 0.25 % (v/v) DMAPN, 2.8mM Natriumsulfit und 1.75 mM Ammoniumpersulfat. Der Gelpuffer diente auch als Anoden- und Kathodenpuffer. Elektrophoresebedingungen: 70 mA/Gel. Laufstrecke von Bromphenolblau als Marker : 9 cm.

Die Proteine (1mg/ml) wurden zur gleichmäßigen Beladung mit SDS bei 100° C für 1 Min. in einer Lösung von 1 % SDS, 1 % ß-Mercaptoäthanol in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.1 inkubiert (Weber et al., 1972). Pro Geltasche wurden 10 - 50 µg Protein appliziert. Referenzprotein (1 mg/ml): Rinderserumalbumin (MG 67 000), Hühnereialbumin (MG 43 000), Chymotrypsinogen A (MG 25 700), Lysozym (MG 14 300).

Die Gele wurden für 3 Std. in 200 ml einer Lösung aus 0.05 % Coomassie-Blau G 250, 60 g Trichloressigsäure, 800 ml Wasser, 200 ml Methanol und 80 ml Eisessig gefärbt. Bei der hier angegebenen Vorschrift wurde in Abänderung der Originalmitteilung (Stegemann et al., 1973) Coomassie-Blau R 250 durch Coomassie-Blau G 250 in höherer Konzentration ersetzt. Bei Verwendung des Entfärbemediums aus 5 % Methanol und 7,5 % Eisessig (Weber et al., 1972) konnte somit eine wesentliche Steigerung der Farbintensität der Proteinbanden erreicht werden. Entfärbung der Gele erfolgte durch Diffusion auf einer Wiegewippe durch mehrmaliges Wechseln des Entfärbemediums.

4.6.2. SDS-PAA-Gradientengel-Elektrophorese

In SDS-Gelen läßt sich eine wesentliche Verbesserung in der Auflösung von Einzelbanden, besonders in Molekulargewichtsbereich $< 20\,000$, durch Anwendung von Gelgradienten in Kombination mit diskontinuierlichen Puffersystemen erzielen (Neville, 1971; Chua & Bennoun 1975). Allerdings sind hier in dem o.a. Molekulargewichtsbereich Abweichungen von der linearen Korrelation zwischen dem log des Molekulargewichts und der Wanderungsstrecke möglich. Für die vergleichende Analyse der Polypeptidmuster wurde wegen des hohen Auflösungsvermögens das im Detail von Chua & Bennoun beschriebene Elektrophoresesystem unter Verwendung einer Elektrophoreseapparatur nach Studier (1973) genutzt.

Gellösungen für das Trenngel:

A. 15 % Monomer (Acrylamid:Bis = 30:0.8) in 420.4 mM Tris-30.8 mM HCl-Puffer pH 9.18 mit 0.1 % SDS, 60 % Saccharose. Die Polymerisation erfolgte nach Zugabe von 1.65 mM Ammoniumpersulfat und 0.022 % (v/v) TEMED.

B. 7.5 % Monomer (Monomerverhältnis wie oben) in gleichem Puffer wie A. mit 5 % Saccharose. Zur Polymerisation wurden 1.65 mM Ammoniumpersulfat und 0.044 % (v/v) TEMED zugegeben.

Die Glasplatten wurden an den Abstandshaltern mit einer rasch polymerisierenden Gellösung aus 7.7 % Monomer, 0.1 % (v/v) TEMED und 17.5 mM Ammoniumpersulfat abgedichtet. Lineare Gelgradienten von 20 cm Länge und 1 mm Dicke wurden durch Mischen von je 38 ml der Lösung A und B mit einem Buchler-Gradientenmischer (Bender & Hobein, Karlsruhe) hergestellt. Die Präparation der Gele erfolgte bei Zimmertemperatur. Isobutanol diente als Überschichtungsmedium. Auf das Trenngel wurde ca. 2 cm hoch ein Sammelgel folgender Zusammensetzung aufpolymerisiert:

Gellösung für das Sammelgel:

C. 6 % Monomer (Acrylamid:Bis = 30:0.8) in 26.7 mM H_2SO_4 - 1 mM Tris-Puffer pH 6.1, 0.1 % SDS. Polymerisation der Gele durch Zugabe von 4.38 mM Ammoniumpersulfat und 0.1 % (v/v) TEMED.

Oberer Kathodenpuffer: 40 mM Tris-41 mM Borsäure, pH 8.64, 0.1 % SDS. Unterer Anodenpuffer: siehe Trenngelpuffer. Elektrophoresebedingungen: 16 mA/Gel, spannungskonstant, 15 Std.,

Aus den monomeren Stammlösungen wurden Verunreinigungen, die eine schwachgelbe Färbung verursachten, durch Behandlung mit Aktivkohle (2 g/l, Merck, Darmstadt) entfernt. Die Aktivkohle kann durch Filtrieren (Faltenfilter oder Millipore 1,2 µm, anschließend 0.45 µm Millipore-Filter) vollständig beseitig werden. Die SDS-Qualität von Pierce (Rockford, USA) erlaubt eine Lagerung der gebrauchsfertigen Gele in einer feuchten Kammer bei 4° C für mehrere Wochen, ohne daß SDS auskristallisiert.

Die Proben (Endkonzentration von 1 mg/ml) waren in einer Inkubationslösung aus 50 mM Natriumcarbonat, 50 mM Dithiothreitol, 2 % SDS und 12 % Saccharose gelöst. Inkubation: 1 Min. bei 100° C. Probevolumen/Geltasche: 10 - 40 µl. Die Proteinbanden wurden 2 Std. in einer Mischung aus Methanol, Eisessig und H_2O (5 : 1 : 5, v/v) fixiert und anschließend 2 - 5 Std. mit 0.05 % Coomassie-Blau G 250 in Fixiermedium gefärbt. Entfärbung erfolgte mit 7 % Essigsäure. Die Quellung der Gele erlaubt eine zusätzliche Spreizung eng zusammenliegender Banden.

4.6.3. Harnstoff-PAA-Gelelektrophorese

Für vergleichende Untersuchungen der Polypeptidmuster sowie zur weiteren Analyse der in der SDS-Gelelektrophorese einheitlich wandernden Untereinheiten wurden 2 mg gefriergetrockneter Proben bei 40° für zwei Stunden in 1 ml einer mit Eisessig auf pH 3.2 eingestellten Lösung von 9 M Harnstoff, 100 mM ß-Mercaptoäthanol inkubiert. Um den Einfluß nicht vollständig reduzierter S-S-Brücken auszuschalten (Poole et al. 1974), wurden zusätzlich Proben (2 mg/ml), gelöst in 9 M Harnstoff, 10 mM ß-Mercaptoäthanol und 0.11 M Tris-HCl-Puffer pH 8.2 für 4 Stunden bei 40° reduziert und durch Zugabe von 30 mg Jodacetamid carboxymethyliert (Hirs, 1967, modifiziert nach Poole et al. 1974). Die im Dunkeln durchgeführte Reaktion wurde nach 30 Min. durch Ansäuern (0.2 ml Eisessig pro ml Probe) unterbrochen.

Für die Harnstoff-Gelelektrophorese nach Panyim & Chalkley (1969) wurden 10 %-ige Gele (0.5 x 8.5 cm) mit 8 M Harnstoff und 0.9 M Essigsäure verwendet, auf die zur Verbesserung der Trennschärfe ein 5 %-iges Sammelgel polymerisiert war. Anodenpuffer (oben)und Kathodenpuffer: 0.9 M Essigsäure. Nach Applikation von 100 µl/Gel einer Lösung von 8 M Harnstoff, 2 mM Methylgrün (Indikator für die Wanderungsfront) in 0.9 M Essigsäure wurde bei 7.5 V/Gel für 14 Stunden eine Vorelektrophorese durchgeführt. Die überschichtete Harnstofflösung wurde anschließend gegen Elektrodenpuffer ausgetauscht. Die Elektrophorese der Proben (10 - 30 µl/Gel) erfolgte bei 10 V/Gel für ca. 4 Stunden. Zur Färbung der Gele mit Amidoschwarz und zur Entfärbung vgl. Kap. II. 4.5.2..

4.7. Homogenitätstest für die isolierten Biliproteide

4.7.1. PAA-Flachgel-Elektrophorese

Die Durchführung analytischer Flachgel-Elektrophoresen entsprach den methodischen Vorschlägen von Stegemann et al. (1973). Zum Ansatz und zur Polymerisation der 3 mm dicken 5 % Gele, präpariert mit 30 mM Tris-Borsäurepuffer pH 7.9 siehe Kapitel II.4.6.1.. Anoden- und

Kathodenpuffer wie Gelpuffer. Elektrophoresebedingungen: 60 mA/Gel (450 - 500 V), 2 Std. Probe 10 - 50 µg Protein pro 10 - 30 µl für eine Geltasche. Zur Färbung und Entfärbung der Gele siehe Kap. II. 4.6.1.

4.7.2. Isoelektrische Fokussierung in PAA-Gelen

Um Molekülsiebeffekte bei Fokussierung besonders des Phycoerythrins auszuschließen, wurde die von Wrigley (1968) vorgeschlagene Methode wie folgt modifiziert:

4 % Monomer (Acrylamid:Bis = 37.5:1), versetzt mit 1.5 % Ampholine pH 3.5 - 5 und 0.1 % Ampholine pH 5 - 8 sowie 7.5 % Saccharose, wurden durch Zugabe von 0.7 mM Ammoniumpersulfat und 0.053 % (v/v) TEMED eine Stunde lang in Glasröhrchen (i.D. 0.55 cm x 10 cm) polymerisiert. Überschichtungsmedium: Isobutanol. Zur Fokussierung wurden nach vollständiger Entfernung des Isobutanols je 50 µl einer Lösung aus 7.5 % Saccharose und 0.1 % Ampholine pH 6 - 8 auf die Gele pipettiert. Unter diese Sperrlösung wurde die gegen 1 % Glycin dialysierte und mit Saccharose (10 %) beschwerte Probe unterschichtet. Proteinkonzentration pro Gel: 10 - 50 µg, gelöst in 10 - 70 µl 1 % Glycin. Elektrodenlösungen: Anode (unten): 1.5 % Essigsäure, Kathode (oben): 0.1 % Äthanolamin. Fokussierung: 4 Std. bei anfangs 150 V und letztlich 300 V (6 - 9 Gele). Die Färbung der Gele mit Coomassie-Blau R 250 und die Entfärbung erfolgte nach der Methode von Vesterberg (1971).

4.8. Isoelektrische Punkte

Die isoelektrischen Punkte der isolierten Biliproteine wurden nach Fokussierung in granulierten Gelen bestimmt (siehe Kap. II. 3.2.3.). Die separierten Biliproteide wurden mit 1.5 ml einer Lösung aus 10 mM Kaliumchlorid und 1 mM ß-Mercaptoäthanol vom Gel extrahiert und die pH-Werte bei 10° C mit einem Digital-pH-Meter Typ 640 der Fa. Knick (Berlin) über eine pH-Elektrode Typ 405-NF (Ingold, Frankfurt) gemessen. 60 Sek. nach dem Eintauchen der Elektrode in die Probenlösung konnte ein konstanter pH-Wert abgelesen werden.

4.9. Quantitative Aminosäureanalyse

Gefriergetrocknetes Biliproteidmaterial (1.5 mg/Pigmenttyp) wurden in ein Inkubationsglas eingewogen, in 4 ml 6 N HCl aufgenommen, mit Stickstoff durchspült, und nach Abschmelzen des Glases in Stickstoffatmosphäre 24 Std. bei 110° C hydrolysiert. Nach Teilung der Ansätze wurde eine Probenhälfte im Rotavapor eingeengt und mit 5 ml 0.2 M Citratpuffer pH 2.2 aufgenommen. Das Hydrolysat gelangte direkt zur Analyse. Die andere Hälfte wurde weitere 24 Std. hydrolysiert und anschließend wie oben beschrieben verarbeitet. Der Aminosäuregehalt der Proben wurde mit einem automatischen Aminosäureanalysator, Typ BioCal 100, ermittelt. Zur Methodik siehe Moore und Stein (1963). Probevolumen: 2.5 ml/Passage. Unter den gegebenen Bedingungen läßt sich Tryptophan nicht, Asparagin und Glutamin nur als Asparaginsäure bzw. Glutaminsäure nachweisen. Die Prozentgehalte der einzelnen identifizierten Aminosäuren lassen sich errechnen nach Addition der aus dem Chromatogramm durch Integration ermittelten Nanomol-Werte und Gleichsetzen der Summe mit 100 %.

4.10. Cross-Linking-Experimente

Glutaraldehyd reagiert als bifunktioneller Aldehyd in neutralen bzw. schwach sauren Medien durch Bildung Schiff'scher Basen mit freien NH_2-Gruppen von Aminosäuren, besonders von Lysin, und führt somit zur Vernetzung und Stabilisierung räumlich assoziierter Proteinstrukturen (Russel & Hopwood, 1976). Präparationen intakter Dreiereinheiten (0.2 - 0.6 mg/ml) wurden mit Glutaraldehyd in einer Endkonzentration von 0.05 % für 30 Min. bei Zimmertemperatur inkubiert. Zur Dissoziation unvollständig vernetzter Einheiten, zur Reduktion der Puffermolarität sowie zur Entfernung nichtgebundenen Glutaraldehyds wurden die Proben 3 - 5 Std. gegen 30 mM Phosphatpuffer pH 5.7 bzw. 7.0 dialysiert und in KollodiumhÜlsen angereichert. Die Trennungen und Molekulargewichtsanalysen in Gradientengelen erfolgte nach Kap. II. 4.5.2..

Zur Aufnahme von Absorptionsspektren wurden separierte Banden mit einer Rasierklinge aus dem Gel herausgeschnitten und 8 - 16 Gelscheiben im Potter Homogenisator (Braun, Melsungen) per Hand zerstoßen. Die Proteine wurden durch Zugabe von 2 x 1 ml 30 mM Phosphatpuffer pH 7.0 aus dem Gel extrahiert. Zur Abscheidung der Gelpartikel wurden die Suspensionen in Eppendorf Caps zentrifugiert (10 000 x g/ 5 Min.) und der Überstand spektralphotometrisch in Halbmikro-OS-Küvetten vermessen.

Als weitere Vernetzungsagenzien dienten neben Glutaraldehyd Dimethyl-Suberimidat sowie Dithiobispropionimidat (Davies & Stark 1970; Aizawa et al., 1977).

A. 1 ml einer Dreiereinheitenfraktion (0.5 mg Biliproteid/ml) in 0.65 M Phosphatpuffer pH 7.0 wurde mit je 1 ml einer Lösung von 0.2 - 1 mg DMS in 0.2 M Triäthanolamin/HCl-Puffer pH 8.8 versetzt und für 60 bzw. 90 Min. bei 20°C inkubiert. Nach Hinzufügen von 1 ml eiskaltem destilliertem Wasser wurde das so gestoppte Reaktionsgemisch bei 4°C gegen destilliertes Wasser in Ultrahülsen angereichert und ohne weitere Behandlung zur Elektrophorese eingesetzt.

B. Für die Vernetzungsreaktion mit DTBP wurden 0.5 mg Biliproteid/ml jeweils 0.5 - 5 mM DTBP zugegeben, das vor jedem Experiment jeweils frisch in 10 bzw. 100 mM Tris-HCl-Puffer pH 8 und pH 8.8 gelöst worden war. Die Proben wurden unter leichtem Schütteln für 30 Min. bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wurde unterbrochen durch Absättigung ungebundener funktioneller Gruppen mit einem Überschuß an Ammoniumchlorid (5 - 50 mM). Die Anreicherung und Reduktion der Puffermolaritäten erfolgte wie oben.

4.11. Elektronenmikroskopie

Phycobilisomen und Dreiereinheiten (0.2 - 0.5 mg/ml) wurden un-

mittelbar nach Fraktionierung aus dem Dichtegradienten mit 0.5 - 1 % Glutaraldehyd (Endkonzentration) für 10 - 30 Min. fixiert und anschließend für 2 - 3 Std. gegen destilliertes Wasser dialysiert, um die Quantitäten an Saccharose, Phosphat und Glutaraldehyd zu reduzieren. Ein Tropfen der dialysierten Suspension wurde auf ein mit Formvar befilmtes, kohlestabilisiertes und hydrophilisiertes 400 Mesh Kupfernetzchen aufgetropft. (Kohlebedampfung: 2 Sek., 8 - 16 V. Hydrophilisierung: 5 Sek., 6 000 V, unter Verwendung einer Balzers Typ 301-Bedampfungsanlage). Nach ca. 30 - 120 Sek. Adsorption wurde das Lösungsmittel mit Filterpapier vom Netzchen abgesaugt und mit 1 Tropfen destilliertem Wasser nachgewaschen.

Die Negativkontrastierung erfolgte nach methodischen Angaben von Nermut (1973) mit 1 % Phosphorwolframsäure pH 6.8 oder 1 % Uranylacetat pH 4.5. Färbedauer: 30 - 60 Sek. Alternativ wurden gleiche Volumina an fixiertem Biliproteidmaterial mit 2 % Uranylacetat oder 2 % Phosphorwolframsäure gemischt (30 - 60 Sek.) und 1 Tropfen auf die hydrophilisierten Netzchen pipettiert. Adsorptionsdauer: 30 - 120 Sek. Der Überschuß an Färbelösung wurde mit Filtrierpapier vom Netzchen entfernt und die Präparate direkt mit einem Philips-301 G-Elektronenmikroskop untersucht.

III. ERGEBNISSE

Zum besseren Verständnis des methodischen Vorgehens bei der Analyse der Biliproteidverteilung in den Phycobilisomen von Rhodella violacea dient Abb. 3. Sie läßt die drei wesentlichen Richtungen des experimentellen Ansatzes erkennen, die gleichzeitig die Grundlage zur Gliederung der vorliegenden Ergebnisse wurden. Demnach werden die proteinchemischen Eigenschaften der isolierten Biliproteide zuerst behandelt, da besonders die Kenntnis des Absorptions- und Fluoreszenzverhaltens, der Extinktionskoeffizienten sowie der Molekulargewichte von grundsätzlicher Bedeutung für die Charakterisierung der Phycobilisomen und Dreiereinheiten waren.

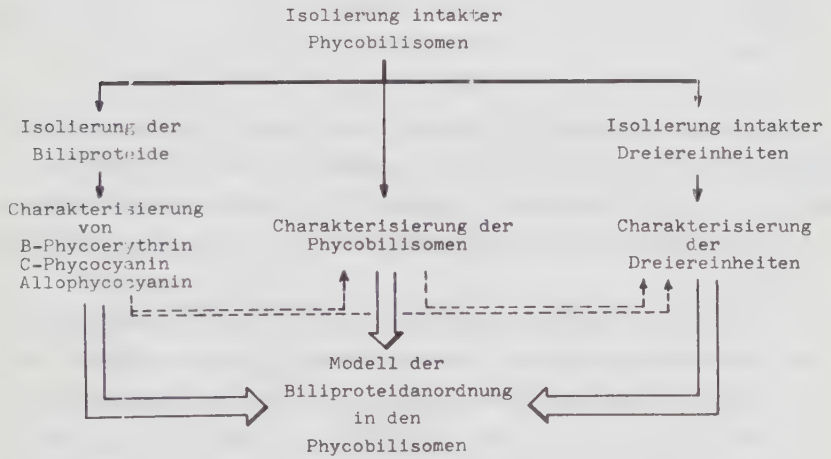

Abb. 3: Übersicht über die Methodik zur Entwicklung eines Modells zur Biliproteidanordnung in den Phycobilisomen von Rhodella violacea

1. Isolierung der Phycobilisomen

Nach Ultrazentrifugation der mit Triton X 100 oder Nonidet P 40 behandelten Zellhomogenate trennt sich in einem kontinuierlichen Gradienten von 0.2 - 0.75 M Saccharose in 0.65 M Phosphatpuffer pH 7.0 eine rascher wandernde, blauviolette Biliproteidhauptfraktion von zwei untergeordneten, rötlichblau bzw. rötlich erscheinenden Banden (Abb. 4). Die Hauptfraktion, im folgenden als Phycobilisomenfraktion angesprochen und beschrieben, repräsentiert 75 - 80 % des Gesamtbiliproteidgehalts pro Zentrifugenröhrchen. Der verbleibende Anteil befindet sich in den beiden kleineren Banden, von denen die rötliche überwiegen Phycoerythrin, die rötlichblaue Aggregate aus Phycoerythrin und Phycocyanin enthält (vgl. Kap. III. 4.1.). Ein ähnliches Verteilungsmuster tritt auch nach Anwendung der Schnellmethode auf (Abb. 5). Jedoch trennen sich hier auf Grund der Steilheit des Gradienten sowie der kurzen Zentrifugationszeit bei gleichem Schwerefeld die beiden Nebenfraktionen nicht auf, so daß eine einheitliche, rötlichblaue Bande erscheint.

Die in der vorliegenden Untersuchung entwickelten kontinuierlichen Gradienten waren in der Einfachheit der Herstellung sowie der Trennschärfe den ebenfalls getesteten Stufengradienten überlegen, da chlorophylltragende Membranreste vollständig eliminiert wurden (vgl. Kap. III. 3.1./3.2.).

Die Ausbeute an Phycobilisomenmaterial ist im wesentlichen abhängig von der Detergenzkonzentration sowie der Molarität und dem pH-Wert des bei der Isolation verwendeten Puffers. Den Einfluß der Detergenzkonzentration verdeutlicht Tab. 1. Nach Behandlung von identischen Zellhomogenaten mit 0.1 % Triton X-100 gegenüber den standardmäßig verwandten 1 % reduziert sich bei gleicher Einwirkdauer die Ausbeute um ca. 30 % (Tab. 1 Längere Gesamtinkubationszeiten als 25 Min. (Inkubationszeit 10 Min. + Reinigungszentrifugation 15 Min.) konnten die Ausbeute nicht wesentlich steigern. Um artifiziellen Veränderungen durch das Detergenz vorzubeugen, wurde daher ein Kompromiß zwischen hoher Ausbeute einerseits und möglichs niedriger Detergenzkonzentration (0.5 %) und kurzer Einwirkzeit (20 Min.)

Detergenzkonzentration	Ausbeute (%)	
	Triton X 100	Nonidet P 40
1 %	100	100
0.5 %	90	86
0.1 %	71	68

Tab. 1: Abhängigkeit der Phycobilisomen-Ausbeute von der Art und Konzentration des Detergenz.

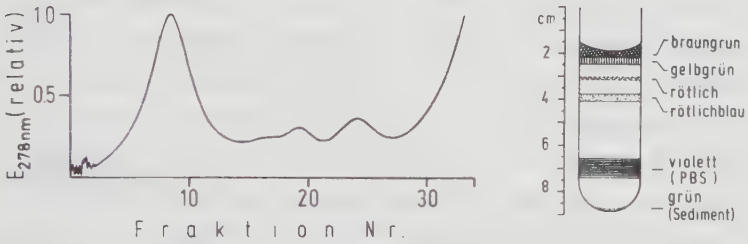

Abb. 4: Bandenverteilungsmuster im Dichtegradienten und Elutionsprofil nach Isolierung der Phycobilisomen aus Triton X 100 behandelten Zellhomogenaten durch Ultrazentrifugation bei 120 000 x g, 15 Std. Die Position der Phycobilisomenbande im Dichtegradienten korrespondiert mit dem dominierenden Proteinmaximum im Elutionsprofil.

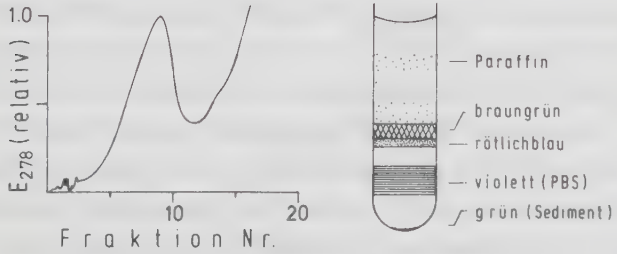

Abb. 5: Isolation der Phycobilisomen nach der Schnellmethode durch Ultrazentrifugation bei 120 000 x g, 3.5 Std.

andererseits angestrebt. Bei der Isolation der Phycobilisomen von Porphyridium cruentum und Nostoc sp. betrug die Gesamtinkubationsdauer 45 bzw. 55 Min. bei einer Detergenzkonzentration von 1 % Triton X 100 (Gantt & Lipschultz, 1972; Gray & Gantt, 1975). Entsprechende Konzentrationen wurden erfolgreich bei der Präparation intakter ATP-ase Partikel angewendet (Berden & Voorn-Brouwer, 1978). Ribosomen als vergleichbar große Proteinaggregate konnten noch nach Behandlung mit 5 % Triton funktionsfähig isoliert werden (Parthier, 1974).

Um zu überprüfen, ob die Phycobilisomen vollständig ohne Verlust einzelner Komponenten durch Triton extrahiert werden, wurde mit Nonidet P 40 ein weiteres nichtionisches Detergenz angewendt. Tab. 1 zeigt einen Vergleich der Wirksamkeit beider Detergenzien. Phycobilisomenisolate nach NP 40 wie auch Tritonbehandlung erwiesen sich als identisch hinsichtlich ihrer spektroskopischen Daten. Die hochauflösende SDS-Gelelektrophorese belegt eine übereinstimmende Untereinheitenstruktur nach der Anzahl und der Anfärbung der einzelnen Polypeptide (Abb. 6). Die in der Literatur beschriebenen Detergenzien Brij 56, Tween 80 und Desoxycholat erwiesen sich alle bei der Phycobilisomenisolierung als dissoziationsfördernd (Gantt & Lipschultz, 1972; Gray et al., 1973) und wurden daher nicht in die Untersuchungen mit einbezogen.

Die Molarität und der pH-Wert des Puffers beeinflussen die Ausbeute sowie die Strukturerhaltung der Phycobilisomen merklich. Phosphatkonzentrationen < 0.5 M beim Aufschluß und bei der Trennung bewirken wohl auf Grund partieller Dissoziation einen Anstieg des Anteils an freiem Biliproteidmaterial in den beiden Nebenfraktionen, verbunden mit der Abnahme des Phycobilisomengehalts in der Hauptfraktion. Bei Aufarbeitung in 0.3 M Phosphatpuffer pH 7.0 liegen die Konversionsraten schon bei ca. 25 %. Demgegenüber ändert sich das Verteilungsmuster in Gradienten bei Molaritäten > 0.65 M nicht wesentlich. Wenn pH-Werte < 6.5 und > 8.0 bei der Isolierung der Phycobilisomen eingestellt werden, treten ähnliche Dissoziationseffekte wie nach der

Abb. 6: Vergleich der Untereinheitenmuster von Phycobilisomen, die nach Inkubation mit 0.5 % Triton X 100 (A) bzw. Nonidet P 40 isoliert worden waren. SDS-Gradientengel-Elektrophorese nach Chua & Bennoun (1975). Anode unten.

A B

Reduktion der Puffermolarität auf. Diese sind offensichtlich durch eine pH - abhängige Lockerung der Phycobilisomenstruktur bedingt (vgl. Kap. III. 3.2.). Bei pH-Werten um 7.0 dagegen wird wegen der nahezu übereinstimmenden quantitativen Biliproteidkomposition von Phycobilisomen und wässrigen Gesamtextrakten (Kap. III. 3.3.) sowie des optimalen Energietransfers (Kap. III. 3.2.) ein maximaler Stabilisierungsgrad erreicht.

Die Art des Zellaufbruchs hat augenscheinlich keine Auswirkungen auf die Intensität der Banden zueinander sowie auf das Verteilungsmuster in den Gradienten. Werden Zellen schonend durch Zerreiben mit Seesand im Mörser in Gegenwart von 0.65 M Phosphatpuffer pH 7.0 aufgeschlossen, so resultiert nach niedertouriger Zentrifugation ein ungefärbter, biliproteidfreier Überstand. Die Phycobilisomenisolierung aus den Zellfragmenten und Membranen des Zentrifugats ergibt gleiche

Ergebnisse wie in Abb. 4 dargestellt. Daher muß das Auftreten der Banden als Resultat der Detergenzbehandlung und nicht der Fragmentierungsmethode angesehen werden.

Zweiwertige Kationen, deren Bedeutung bei der Stabilisierung der Ribosomen bekannt und bei der Assoziation von Thylakoiden zu Grana gefordert wird (Boardman et al., 1966; Murakami & Packer, 1971), scheinen die Bindung der Phycobilisomen an den Thylakoidmembranen nicht zu beeinflussen. Wird an Stelle des Detergenz mit Na-EDTA (1 - 5 mM) zur Komplexierung divalenter Kationen inkubiert, lassen sich keine Phycobilisomen freisetzen. EDTA-Zusatz und anschließende Detergenzbehandlung ergeben jedoch ein Biliproteidmuster wie in Abb. 4

2. Darstellung und biochemische Charakterisierung der Biliproteide

Die Charakterisierung der Phycobilisomen (Kap. III. 3.) sowie der Dreiereinheiten (Kap. III. 4.) hinsichtlich ihres qualitativen und quantitativen Pigmentgehalts, der molaren Verhältnisse der individuellen Pigmente, ihrer Anordnung sowie ihrer Funktion setzt die Kenntnis der spektralen und proteinchemischen Eigenschaften der am Aufbau eines Phycobilisoms beteiligten Biliproteide voraus. Eine prinzipielle Untersuchung der Biliproteide von Rhodella, die von wässrigen Extrakten ausging, wurde bereits vorgenommen (Koller & Wehrmeyer, 1974). Es erschien jedoch wünschenswert, diese Biliproteide auch aus den Phycobilisomen zu isolieren und sie eingehend zu charakterisieren.

2.1. Isolationsverfahren, Homogenität und Reinheit der Biliproteide

In einem ersten Reinigungsschritt konnte aus dissoziierten Phycobilisomen durch präparative Ultrazentrifugation unter Beibehaltung dissoziationsfördernder Bedingungen das Phycoerythrin nahezu quantitativ vom Phycocyanin und Allophycocyanin getrennt werden. Da-

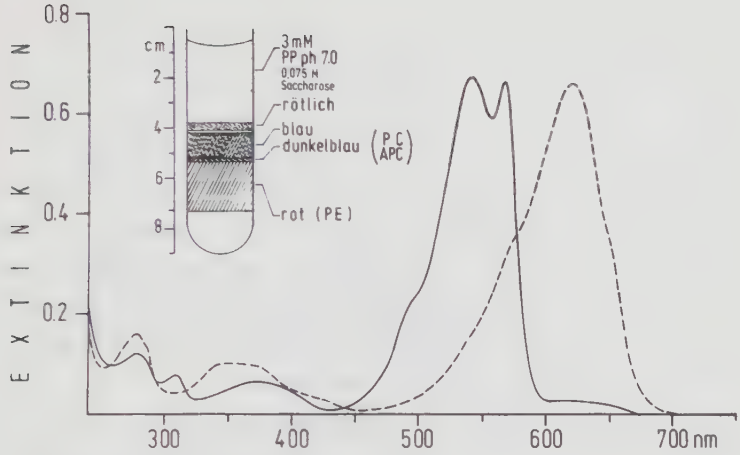

Abb. 7: Verteilungsmuster der Biliproteide im Dichtegradienten nach Ultrazentrifugation dissoziierter Phycobilisomen in 3 mM Phosphatpuffer pH 7.45 bei 113 000 x g für 15 Std.. Die Absorption der roten (——) und blauen Fraktion (----) belegt die fast quantitative Trennung des Phycoerythrins von Phycocyanin/Allophycocyanin.

bei wurden die Molekulargewichtsdifferenzen dieser Pigmente in niedermolaren Puffern konsequent ausgenutzt (vgl. Kap. III. 2.3.).

Abb. 7 zeigt das Verteilungsmuster der Biliproteide im Dichtegradienten sowie die Absorptionsspektren der Phycoerythrin-Fraktion bzw. der Phycocyanin-Allophycocyanin-Mischbande. In der Probenzone bleibt eine schwachrötliche Bande aus Phycoerythrin und Phycocyanin stationär. In ihr scheinen nach den Spektren Phycoerythrin sowie Phycocyaninuntereinheiten lokalisiert zu sein.

Die Reindarstellung von Phycoerythrin erfolgte durch präparative Gelelektrophorese im Sinne von Koller und Wehrmeyer (1975). In pH 8.9-

Gelen trennen sich mehrere, unterschiedlich rasch wandernde Phycoerythrinmodifikationen auf, von denen die beiden mit der geringsten und der höchsten Mobilität isoliert und in einem pH-7.9-System nachgereinigt wurden. Beide Modifikationen erscheinen in der analytischen Elektrophorese, der isoelektrischen Fokussierung im PAA-Gel sowie in der Gradientengelelektrophorese (Abb. 9) als homogene Proteide mit unterschiedlichem Wanderungsverhalten. Auf Grund der entsprechenden elektrophoretischen und spektralen Eigenschaften im Vergleich zu B-Phycoerythrin I und II, die aus Rohextrakten isoliert worden waren (Koller & Wehrmeyer, 1975), werden auch in der vorliegenden Arbeit die Indices I und II für das Phycoerythrin mit der höheren bzw. geringeren elektrophoretischen Mobilität beibehalten.

Die Auftrennung von Phycocyanin und Allophycocyanin aus der Mischfraktion nach Ultrazentrifugation gelingt durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex A-50. Das Elutionsprofil in Abb. 8 weist neben den Phycocyanin- und Allophycocyanin-Hauptfraktionen zusätzliche, in der Reihenfolge der Elution mit Phycocyanin I und Allophycocyanin II bezeichnete Banden auf. In beiden Fällen entsprachen die Untereinheitenmuster sowie die Absorptionsspektren denen der Hauptfraktionen, so daß die Vermutung nahe liegt, daß Phycocyanin I und Allophycocyanin II Dissoziations- bzw. Aggregationsprodukte darstellen.

Zur Reindarstellung von Phycocyanin und Allophycocyanin aus den Hauptfraktionen war ein weiterer Trennungsschritt erforderlich, da die Phycocyaninfraktionen, besonders bei Ausnutzung der maximalen Austauscherkapazität, Spuren von Allophycocyanin und die Allophycocyanin-Präparationen Kontaminationen durch Phycocyanin aufwiesen. Diese ließen sich durch die isoelektrische Fokussierung in granulierten Gelen vollständig beseitigen. Das Allophycocyanin verhielt sich in den analytischen Testverfahren ebenso wie die Phycoerythrine als einheitliches Protein. In den Phycocyanin-Präparationen erschien eine weitere, schwach blau gefärbte Proteinbande, die auf Grund der

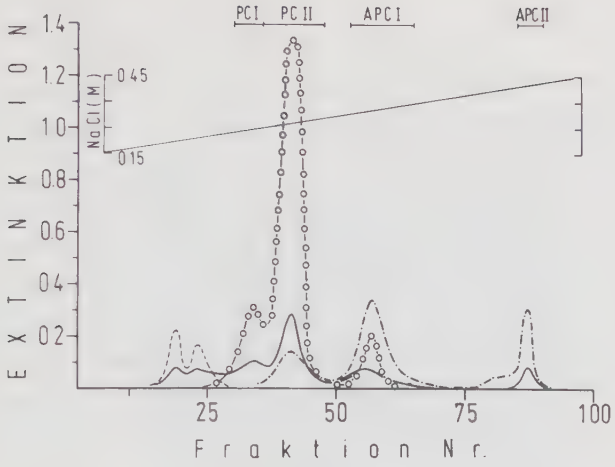

Abb. 8: Elutionsdiagramm der Trennung von Phycocyanin und Allophycocyanin durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex A-50. Extinktionsmessung bei 278 nm (——), 542 nm (----), 618 nm (-o-o-) und 652 nm (-·-·-).

spektralen Eigenschaften, dem entsprechenden Untereinheitenmuster sowie einem Molekulargewicht von ca. 260 000 (vgl. Kap. III. 4.6.) als offensichtlich hexamere Aggregationsform zu werten ist.

Neuerdings wurden von Ley et al. (1977) aus den Rotalgen Porphyridium cruentum und Porphyridium aerugineum sowie aus verschiedenen Cyanophyceen ein vom Allophycocyanin abweichender Biliproteidtyp mit der Bezeichnung Allophycocyanin B isoliert und charakterisiert (Bryant et al., 1976). Dieser Pigmenttyp ist durch Absorptionsmaxima bei 669 und 671 nm sowie Fluoreszenzmaxima bei 673 bzw. 680 nm ausgewiesen. Die Autoren nehmen an, daß die Fluoreszenz der Phycobilisomen bei 675 - 680 nm diesem Pigment zuzuordnen ist. Bei der Isolierung der einzelnen Biliproteide aus Rhodella gab es keine schlüssigen Hinweise auf die Gegenwart von Allophycocyanin B in den Phycobilisomen. Darüberhinaus

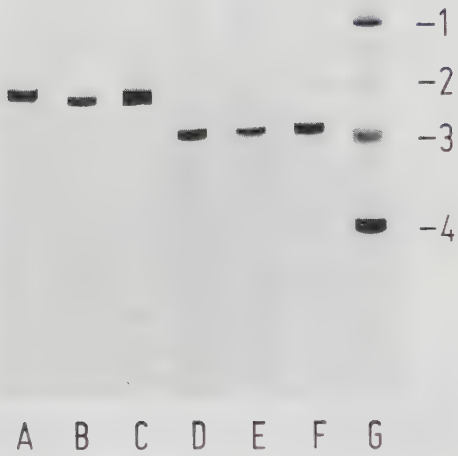

Abb. 9: Gradientengel-Elektrophorese der gereinigten Biliproteide. B-Phycoerythrin I (A) und II (B), Gemisch aus I und II (C), Allophycocyanin (D), C-Phycocyanin (E), Gemisch aus Phycocyanin und Allophycocyanin (F). Molekulargewichtsmarker (G): (1) Ferritin (MG 450 000), (2) Katalase (MG 240 000), (3) Rinderserumalbumin Dimer (MG 134 000) und (4) Monomer (MG 67 000). Gelgradient von 3.5 - 26.3 %. Elektrophoresebedingungen vgl. Kap. II. 4.2.5.. Anode unten.

fluoreszieren die Phycobilisomen von Rhodella in Lösungen vergleichbarer Konzentrationen bei 665 nm. Daher muß die von Ley et al. aufgestellte These, Allophycocyanin B sei ein genereller Bestandteil in Phycobilisomen, neu überdacht werden.

2.2. Spektraldaten

Die Absorptions- und Fluoreszenzspektren der isolierten Biliproteide in Abb. 10 bzw. 11 sprechen für die Reinheit der Pigmente und lassen ihre Charakterisierung im Sinne von Haxo und O'h Eocha (1960) als B-Phycoerythrin, C-Phycocyanin und Allophycocyanin zu. Tab. 2 faßt die Absorptions- und Fluoreszenzcharakteristika der einzelnen Biliproteide zusammen. Für das Verständnis des in den Phycobilisomen stattfindenden Energietransfers (Kap. III. 3.2.) sei auf die deutliche Überlappung der Fluoreszenzemission der Phycoerythrine mit der Absorption des Phycocyanins sowie der Fluoreszenzemission des Phycocyanins mit der Absorption des Allophycocyanins hingewiesen.

Biliproteid	ABSORPTION (nm) Hauptmaximum	Nebenmaximum	Schulter	$E_{Max.}/E_{278}$	FLUORESZENZ (nm) Maximum	Schulter
B-PE I	542, 568	376, 308, 278	498, 284	5.4	575	630
B-PE II	542, 568	376, 308, 278	498, 284	4.0	579	630
C-PC	618	358, 278	284	4.9	638	715
APC	652	347, 278	625, 618, 382, 284	5.2	655	

Tab. 2: Absorptions- und Fluoreszenzemissionscharakteristika von B-Phycoerythrin I und II, C-Phycocyanin und Allophycocyanin. Lösungsmittel: 30 mM Phosphatpuffer pH 7.0. Fluoreszenzanregung: 546 nm.

Die Spektraleigenschaften der aus den Phycobilisomen isolierten Biliproteide weichen nur unwesentlich von denen ab, die für diese Pigmente nach Reinigung aus Rohextrakten ermittelt wurden (Koller & Wehrmeyer, 1974; 1975). Die höheren Extinktionsverhältnisse für die Isolate aus Phycobilisomen lassen jedoch darauf schließen, daß

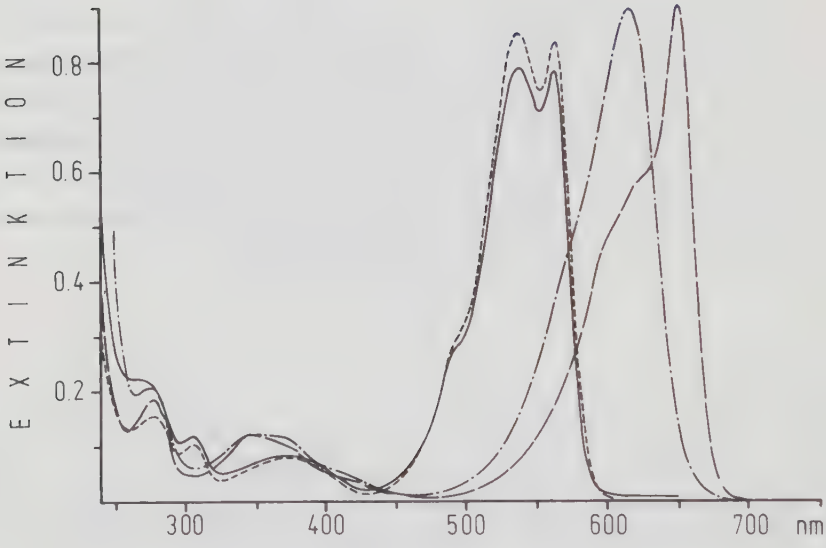

Abb. 10: Absorptionsspektren von B-Phycoerythrin I (——) und II (----), C-Phycocyanin (-·-·-) und Allophycocyanin (— —). Lösungsmittel: 30 mM Phosphatpuffer pH 7.0.

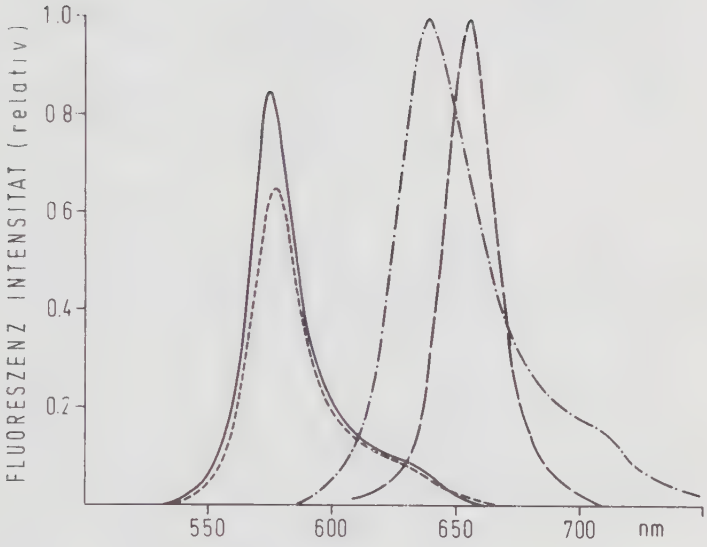

Abb. 11: Fluoreszenzemissionsspektren von B-Phycoerythrin I (——) und II (----), C-Phycocyanin (-·-·-) und Allophycocyanin (— —). Anregung: 546 nm. Lösungsmittel: 30 mM Phosphatpuffer pH 7.0.

Biliproteid	Extinktions-koeffizient (ml/mg, d=1cm)	Puffer	Protein-bestimmungsmethode	Organismus	Autor
B-PE I	5.54	30 mM PP pH 7.0	Lowry et al. (1951)	Rhodella violacea (R)	vorliegende Arbeit
B-PE II	5.63	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.
B-PE	5.26	100 mM PP pH 6.8	Lowry et al.	Porphyridium cruentum (R)	Gantt & Lipschultz (1974)
	10.04	10 mM Ammonium-acetat pH 5.5	Gefriertrocknung, quantitative Aminosäureanalyse	Porphyridium cruentum	Glazer & Hixson (1977)
	8.2	---	---	---	Chapman (1973)
C-PC	5.51	30 mM PP pH 7.0	Lowry et al.	Rhodella violacea	vorliegende Arbeit
	7.74	50 mM Kalium-phosphat pH 7.0	Trocknung in Hitze, Differenzwägung	Cyanidium caldarium (R?)	Brown & Troxler (1977)
	5.92	10 mM PP pH 7.0, 150 mM NaCl	Lowry et al.	Fremyella (C) diplosiphon	Bennett & Bogorad (1973)
	9.07	200 mM Natrium-acetat pH 5.5	Gefriertrocknung, quantitative Aminosäureanalyse	Synechococcus sp. (C)	Glazer et al. (1973)
	7.65	50 mM PP pH 7.0 (10 mg PC/ml)	s.o.	s.o.	Glazer et al. (1973)
	6.43	s.o. (0.5 mg PC/ml)	s.o.	s.o.	Glazer et al. (1973)
APC	5.74	30 mM PP pH 7.0	Lowry et al.	Rhodella violacea	vorliegende Arbeit
	5.00	100 mM PP pH 7.0	Lowry et al.	Porphyridium cruentum	Gantt & Lipschultz (1974)
	6.35	50 mM Kalium-phosphat pH 7.0	Trocknung in Hitze, Differenzwägung	Cyanidium caldarium	Brown & Troxler (1977)
	6.22-7.14	25 mM Ammonium-acetat pH 6.8	Gefriertrocknung, quantitative Aminosäureanalyse	diverse Cyano-bakterien	Cohen-Bazire et al. (1977)
	3.9	100 mM Kalium-phosphat pH 7.0 (APC I, MG 145 000)	Lowry et al.	Nostoc sp. (C)	Zilinskas et al. (1978)
	5.4	s.o. (APC II, MG 105000)	s.o.	s.o.	Zilinskas et al. (1978)

(R) = Rotalge; (C) = Cyanophycee

Tab. 3: Extinktionskoeffizienten von B-Phycoerythrin I und II, C-Phycocyanin und Allophycocyanin aus Rhodella violacea im Vergleich zu Literaturdaten.

durch Verfeinerung der Isolationsmethoden ein jeweils höherer Reinigungsgrad erzielt werden konnte.

Der exakten Bestimmung der Extinktionskoeffizienten kam in der vorliegenden Arbeit besondere Bedeutung zu, da alle quantitativen Abschätzungen der Biliproteidgehalte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz auf diesem Parameter basieren. In Tabelle 3 sind die für B-Phycoerythrin, C-Phycocyanin und Allophycocyanin errechneten Extinktionskoeffizienten zusammengefaßt. Die Werte waren in einem Extinktionsbereich von E = 0.1 - 1.5 (0.015 - 0.3 mg Biliproteid/ml) konstant.

Aus dem Vergleich neuerer Literaturdaten in Tab. 3 wird ersichtlich, daß die Extinktionskoeffizienten für die individuellen, aus den Phycobilisomen von Rhodella isolierten Pigmente notwendigerweise unter einheitlichen, definierten Bedingungen neu bestimmt werden mußten. Die bereits vorliegenden Werte erwiesen sich nämlich als stark abhängig von der Herkunft (Versuchsobjekt), von der Methode der Proteinbestimmung, dem pH und der Ionenstärke des Lösungsmittels sowie - besonders im Fall des C-Phycocyanins - von der Konzentration an Biliproteid.

2.3. Molekulargewichte der nativen Biliproteide

Die Molekulargewichte der isolierten Biliproteide wurden durch Gelchromatographie an Sephadex G-200 und durch Gradientengel-Elektrophorese abgesichert (Tab. 4). Abb. 12 und 13 zeigen die Eichgeraden, die den Molekulargewichtsbestimmungen zu Grunde lagen.

Nach den Molekulargewichtsbestimmungen weisen die Biliproteide von Rhodella violacea unterschiedliche Molekulargewichte auf, wobei die der Phycoerythrine bei den gewählten Bedingungen annähernd doppelt so hoch sind wie die der Phycocyanine. Dieser Befund wird bestätigt durch die Analyse des Sedimentationsverhaltens bei der präparativen Ultrazentrifugation (vgl. Kap. III. 2.1.). Demnach müssen die Phycoerythrine das höhere Molekulargewicht besitzen, da sie in der Zeiteinheit wesentlich schneller sedimentieren (Martin & Ames, 1961). In der Gradienten-

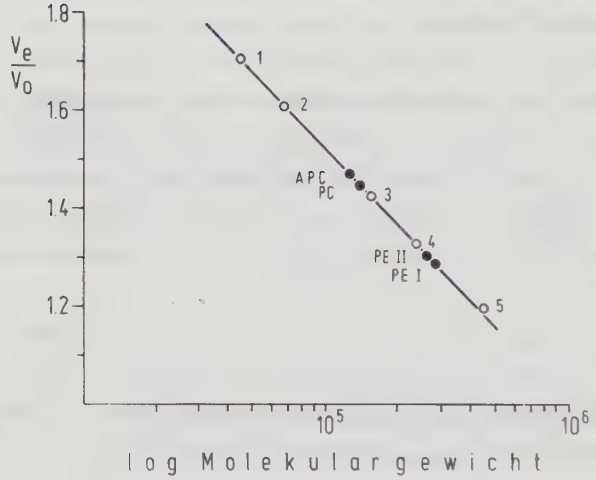

Abb. 12: Abschätzung der Molekulargewichte von B-Phycoerythrin I und II, C-Phycocyanin und Allophycocyanin an geeichter Sephadex G 200 Säule (Kap. II.4.5.1.). Eichproteine: (1) Hühnereialbumin (MG 45 000), (2) Rinderserumalbumin (MG 67 000), (3) Aldolase (MG 147 000), (4) Katalase (MG 240 000) und (5) Ferritin (MG 450 000).

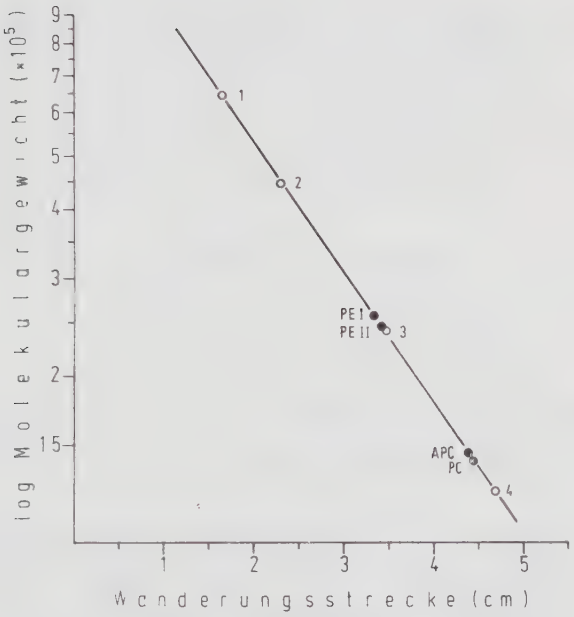

Abb. 13: Abschätzung der Molekulargewichte der Biliproteide nach PAA-Gradientengel-Elektrophorese (Kap. II.4.5.2.). Eichproteine: (1) Thyroglobulin (MG 665 000), (2) Ferritin (MG 450 000), (3) Katalase (MG 240 000), (4) Rinderserumalbumin Dimer (MG 134 000).

Biliproteid	MOLEKULARGEWICHTE		
	Gelchromatographie Sephadex G 200	PAA - Gradientengel-elektrophorese	SDS - Gel-elektrophorese
B-PE I	280 000	260 000	α 18 700 ß 18 700 γ 29 200
B-PE II	265 000	245 000	α 18 300 ß 18 300 γ 29 900
C-PC	139 000	140 000	α 17 200 ß 17 200
APC	130 000	145 000	α 15 900 ß 18 000

Tab.: 4: Molekulargewichte von B-Phycoerythrin I und II, C-Phycocyanin und Allophycocyanin sowie von deren Untereinheiten

gelelektrophorese wandern die Biliproteide homogen in einer Bande mit Ausnahme von Phycocyanin, das bei Konzentrationen von > 30 µg/Gel eine zusätzliche blaue Bande im Molekulargewichtsbereich um 260 000 zeigt (Abb. 9). Bei der Gelchromatographie eluieren die Biliproteide in einem symmetrischen Peak, dessen Position und Ausprägung sich auch bei unterschiedlichen Biliproteidgehalten (0.2 - 2 mg/ml) in den Proben nicht änderte. Nach Gradientengel-Elektrophorese und Gelchromatographie ergeben sich bei den Phycoerythrinen Abweichungen im Molekulargewicht von ca. 9 %, beim Allophycocyanin eine Differenz von 11 %. Die Fehlergrenzen beider Methoden werden mit 5 % bzw. 10 % veranschlagt (Kopperschläger et al., 1969; Andrews, 1965).

Eine gewisse Schwankungsbreite bei der Angabe der Molekulargewichte der nativen Biliproteide ist offensichtlich auf die Methodik der Molekulargewichtsbestimmung zurückzuführen. So wurden für das gleiche B-Phycoerythrin aus Porphyridium cruentum bei vergleichbaren Proteidkonzentrationen und Lösungsmitteln Werte von 238 000 durch

Sedimentationsanalyse nach Gleichgewichtszentrifugation (Glazer und Hixson, 1977), 265 000 durch Gelelektrophorese und 280 000 durch Sephadex G-200-Chromatographie bestimmt (Gantt und Lipschultz, 1974).

Die Molekulargewichte für Allophycocyanin aus Rhodophyceen und Cyanophyceen liegen nach gelchromatographischer Analyse im Bereich 120 000 - 145 000 (Nolan & O'h Eocha 1967; Gantt & Lipschultz, 1974), die des gleichen Pigments aus diversen Cyanophyceen nach Gleichgewichtszentrifugation zwischen 95 000 und 105 000 (Cohen-Bazire et al., 1977; Bryant et al., 1976).

Für das Trimer des C-Phycocyanins, das durch ein ausgeprägtes Aggregations- und Dissoziationsbestreben gekennzeichnet ist, werden in Abhängigkeit vom Versuchsorganismus und der Bestimmungsmethode Molekulargewichte von 105 000 - 138 000 angegeben (Hattori et al., 1965; Hattori & Fujita, 1959; Glazer, 1976; Kao & Berns, 1977).

Eine zusätzliche Kontrolle der Molekulargewichte für die nativen Biliproteide ist unter Berücksichtigung ihrer jeweiligen Aggregationszustände und nach Molekulargewichtsanalyse der Untereinheiten möglich (vgl. Kap. III. 2.4., Tab. 4). Bei pH 7.0 bzw. 7.85, einer Puffermolarität von 30 und 85 mM sowie einer Biliproteidkonzentration von 0.2 - 0.5 mg/ml liegen dominierend die stabilen Aggregationsformen von $(\alpha, \beta)_6\,\gamma$ für B-Phycoerythrin und $(\alpha, \beta)_3$ für C-Phycocyanin und Allophycocyanin vor (Glazer & Hixson, 1977; Glazer, 1976; Kao & Berns, 1977; Nolan & O'h Eocha, 1967; Cohen-Bazire et al., 1977). Auf dieser Basis resultieren für B-Phycoerythrin I und II aus Rhodella violacea Molekulargewichte von 253 600 bzw. 249 500, für C-Phycocyanin und Allophycocyanin 103 200 respektive 101 700.

Die so errechneten Molekulargewichte für die beiden Phycoerythrine stützen die experimentell ermittelten Werte und korrelieren besonders auffällig mit den Ergebnissen nach Gradientengel-Elektrophorese. Dagegen erscheinen die aus der Untereinheitenanalyse abgeleiteten Molekulargewichte für Phycocyanin und Allophycocyanin deutlich erniedrigt gegenüber den Befunden an den nativen Pigmenten. Dieser Effekt kann

darauf zurückzuführen sein, daß die Hydratur und die Form der Proteide in wässrigen Medien einen wesentlichen Einfluß besonders auf die Molekulargewichtsbestimmung durch Gelchromatographie ausüben (Andrews, 1965). Der bei einem Vergleich mit Referenzproteinen zu fordernden globulären Proteinstruktur kommt das kompakte, scheibchenförmige Phycoerythrin am nächsten (Gantt, 1969; Mörschel, 1978). Dagegen kann für das trimere Phycocyanin und Allophycocyanin als ringförmige Aggregate mit einem Durchmesser von 10 - 12 nm und einer Dicke von 2 - 4 nm eher ein abweichenden Verhalten erwartet werden, das höhere apparente Molekulargewichte vortäuscht (Eiserling & Glazer, 1974; Bryant et al., 1976; Mörschel, 1978).

2.4. Untereinheitenanalyse

Um weitere Informationen über den molekularen Bau der Biliproteide zu erhalten, wurden die nativen Proteine durch SDS in Gegenwart von 2-Mercaptoäthanol als Reduktionsmittel in ihre Untereinheiten gespalten und anschließend in der Gelelektrophorese analysiert (Weber et al., 1972). Die Polypeptide des C-Phycocyanins wandern als einheitliche Bande vom Molekulargewicht 17 200. Demgegenüber trennen sich zwei Allophycocyanin-Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 15 900 und 18 000. Phycoerythrin I und Phycoerythrin II weisen jeweils zwei Untereinheiten deutlich unterschiedlichen Färbeverhaltens auf, für die Molekulargewichte von 18 700 und 29 200 sowie 18 300 und 29 900 ermittelt werden konnten. Abb. 14 belegt das unterschiedliche Wanderungsverhalten der Polypeptide. Abb. 15 zeigt die Eichgrade, nach der die Molekulargewichtsbestimmungen vorgenommen wurden. In Tab. 4 sind die Molekulargewichte der Untereinheiten zum Vergleich zusammengefaßt.

Die Polypeptidmuster der Biliproteide ändern sich auch nach Weglassen des Reduktionsmittels nicht; offensichtlich sind daher keine Disulfidbrücken an der intermolekularen Bindung der Untereinheiten beteiligt.

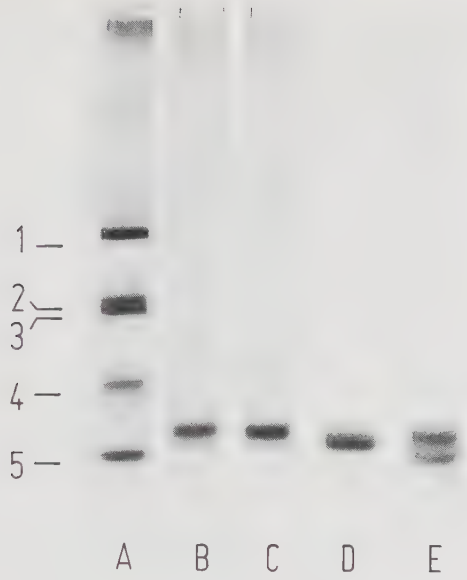

Abb. 14: Untereinheitenanalyse von B-Phycoerythrin I (B) und II (C), C-Phycocyanin (D) und Allophycocyanin (E) nach SDS-Gelelektrophorese in 5 % Gel, 0.1 % SDS, 25 mM Na-Phosphatpuffer pH 7.1. Referenzproteine (A): (1) Rinderserumalbumin (MG 67 000), (2) Hühnereialbumin (MG 43 000),(3) Aldolase (MG 40 000), (4) Chymotrypsinogen A (MG 25 700), (5) Lysozym (MG 14 300). Anode unten.

Für C-Phycocyanin ist das Auftreten von Polypeptiden nur einer Molekülgröße in SDS-Gelen höchst ungewöhnlich (Bogorad, 1975; Glazer, 1976) und nur für den entsprechenden Pigmenttyp aus der thermophilen Cyanophycee Mastigocladus laminosus beschrieben (Binder et al., 1972). Um die Frage zu klären, ob die Phycocyaninuntereinheit sowie jeweils die leichten Untereinheiten von B-Phycoerythrin I und II nur einen Typ von Polypeptidkette oder möglicherweise zwei von jeweils ähnlicher Mobilität repräsentieren, wurden die Pigmente in Gegenwart von 9 M

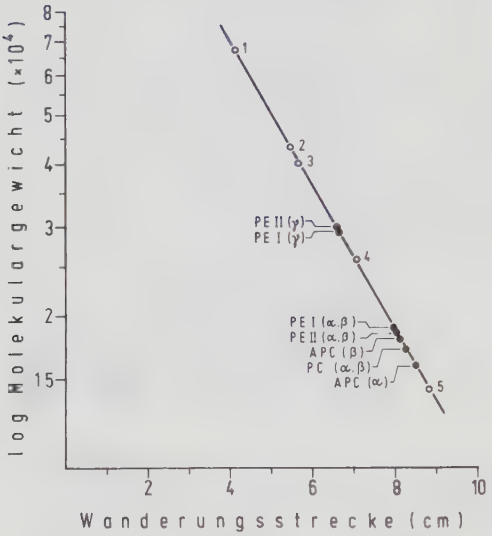

Abb. 15: Bestimmung der Molekulargewichte der Biliproteiduntereinheiten nach SDS-Gelelektrophorese. Referenzproteine wie in Abb. 14.

Harnstoff denaturiert und in der Harnstoff-Gelelektrophorese unter Ausnützung von Ladungsdifferenzen der Ketten als Trennparameter untersucht. Die mit Amidoschwarz gefärbten Gele sind in Abb. 16 dargestellt.

In den Phycocyanin-Proben erscheinen zwei blaugrüne Banden. Die Untereinheit mit der höheren elektrophoretischen Mobilität wird mit α, die mit der geringeren elektrophoretischen Beweglichkeit mit ß bezeichnet (Bogorad, 1975). α - und ß-Untereinheiten stehen nach der densitometrischen Auswertung der ungefärbten Gele bei 612 nm, dem Absorptionsmaximum von C-Phycocyanin in saurer Harnstofflösung, in einem 1 : 2 Verhältnis, nach Proteinfärbung mit Amidoschwarz dagegen

A B C D

Abb. 16: Untereinheitenmuster von B-Phycoerythrin I (A) und II (B), C-Phycocyanin (C) und Allophycocyanin (D) nach Gelelektrophorese in 10 % Gel, 8 M Harnstoff, 0.9 M Essigsäure. Anode oben.

in einem von 1 : 1. Demnach besitzt die ß-Untereinheit bei gleichem Molverhältnis zur α-Untereinheit offensichtlich die doppelte Chromophorenzahl. Diese für ein C-Phycocyanin aus Rhodophyceen erarbeiteten Ergebnisse reihen sich ein in entsprechende Befunde für den gleichen Pigmenttyp aus Cyanidium caldarium und diversen Cyanophyceen (Troxler et al., 1975; Glazer, 1976; Bryant et al., 1978).

Bei gleichem Molverhältnis und entsprechendem Molekulargewicht von α- und ß-Ketten ist eine zusätzliche Absicherung des Molekulargewichts beider Untereinheiten auf Grund der quantitativen Aminosäurekomposition des nativen Phycocyanins möglich (vgl. Kap. III. 2.6.). Das auf der Basis von einem Histidin und drei Chromophoren (MG ca. 550)

pro Monomer (Glazer, 1976) errechnete Molekulargewicht beträgt für eine Untereinheit 17 300. Es stützt damit wesentlich den nach SDS-Gelelektrophorese ermittelten Wert von 17 200.

B-Phycoerythrin I weist nach Analyse in Harnstoffgelen drei rötlich gefärbte Untereinheiten auf, die in der Reihenfolge abnehmender elektrophoretischer Beweglichkeit mit α, γ und ß bezeichnet wurden. Diese Untereinheiten stehen nach Auswertung der densitometrischen Messungen Amidoschwarz gefärbter Proteinbanden in einem Molverhältnis von ca. 4 : 1 : 4. Da die γ -Untereinheit nach Isolierung aus dem Harnstoffgel, Dialyse und abschließender SDS-Behandlung in den SDS-Gelelektrophorese in ihrem Wanderungsverhalten mit der Untereinheit vom Molekulargewicht 29 200 vergleichbar ist, muß das Molverhältnis der Untereinheiten wegen der Molekulargewichtsdifferenz auf ca. 5.5 : 1 : 5.5 hin korrigiert werden.

Bei B-Phycoerythrin II erscheinen dagegen nur 2 Banden, wobei der Proteinanteil der ß-Untereinheit um 15 - 20 % erhöht ist (Abb. 16). Da beide Phycoerythrine in ihren Absorptionsspektren eine ausgeprägte Schulter bei 498 nm besitzen, die ausschließlich auf die Absorption der mit der γ -Untereinheit assoziierten Urobilin-Chromophore zurückgeführt wird (Glazer & Hixson, 1977), ist folglich anzunehmen, daß die γ -Untereinheit in B-Phycoerythrin II ebenso vorhanden ist, aber hier mit der ß-Untereinheit zusammen wandert und daher nicht aufgelöst wird.

Für Allophycocyanin ergibt sich nach Auswertung der ungefärbten Gele sowie nach Anfärbung der Polypeptide mit Amidoschwarz ein gleichbleibendes 1 : 1 Verhältnis für die Quantitäten an Chromophoren bzw. Untereinheiten. Dieser Befund steht im Einklang mit den Ergebnissen von Glazer & Fang (1973) sowie Gysi & Zuber (1974) an Allophycocyanin aus Cyanophyceen. Das bislang nur aus einer weiteren Rotalge, Porphyridium cruentum, näher untersuchte Allophycocyanin wies in SDS-Gelen nur eine Untereinheit auf (Gantt & Lipschultz, 1974). Jedoch unterließen die Autoren die Kontrolle ihrer Befunde z.B. durch Analysen in Gegenwart von Harnstoff.

2.5. Isoelektrische Punkte

Bei der isoelektrischen Fokussierung in granulierten Gelen konzentrieren sich B-Phycoerythrin I, B-Phycoerythrin II, C-Phycocyanin und Allophycocyanin in einer scharfen Bande bei pH 4.44, 4.32, 4.59 bzw. 4.81. Bei hohen Konzentrationen an fokussiertem Material sowie bei Proben, die zur Entsalzung für 2 - 3 Tage dialysiert worden waren, treten bei allen Pigmenten 1 - 3 schwächere Banden auf, die in Übereinstimmung mit den Angaben von Habig & Berns (1973), Glazer & Fang (1973b) sowie Glazer & Hixson (1977) als Dissoziations- bzw. Aggregationsprodukte anzusehen sein dürften. Für C-Phycocyanin aus Phormidium luridum bestimmten Kao et al. (1973) den isoelektrischen Punkt der hexameren Aggregationsform mit 4.6, den der monomeren mit 4.8. Der in der vorliegenden Arbeit gemessene isoelektrische Punkt des Phycocyanins von 4.59 korrespondiert augenscheinlich mit der trimeren Aggregationsform vom Molekulargewicht 140 000, wie die Molekulargewichtsbestimmung in den Gradientengelen bestätigt (vgl. Kap. III. 2.3.). Diese Befunde stehen im Widerspruch zu den Aussagen von Mac Coll et al. (1971b), die als dominierende Aggregationsform im isoelektrischen Punkt das Hexamer fordern.

Die isoelektrischen Punkte der aus den Phycobilisomen dargestellten Biliproteide liegen bis zu 0.13 pH-Einheiten höher als die Werte der aus Rohextrakten gereinigten Pigmente (Koller & Wehrmeyer, 1974), wobei die pH-Werte vormals nach Fokussierung in Dichtegradienten bei 4° C und in der vorliegenden Arbeit nach Fokussierung in granulierten Gelen bei 10° C gemessen worden. Nach Fredrikson (1977) können diese Temperaturdifferenzen für die leichten Verschiebungen der isoelektrischen Punkte verantwortlich gemacht werden. Ebenso sind methodenbedingte Verschiebungen von isoelektrischen Punkten beschrieben (Delincee & Radola, 1977).

Ein Vergleich der hier ermittelten Daten mit Literaturwerten zeigt übereinstimmend, daß die isoelektrischen Punkte aller Biliproteide im sauren pH-Bereich liegen (Koller & Wehrmeyer, 1974; Glazer & Hixson,

1977; Bryant et al., 1976; Cohen-Bazire et al., 1977). Als Ursache muß der überwiegende Anteil saurer Aminosäuren im Apoproteid angesehen werden, wie er für C-Phycocyanin aus Cyanophyceen (Glazer, 1976), B-Phycoerythrin aus Rhodophyceen (Glazer & Hixson, 1977; Koller & Wehrmeyer, 1975) sowie Allophycocyanin aus Cyanophyceen (Gysi & Zuber, 1974; Cohen-Bazire et al., 1977) nachgewiesen ist. Saure Zucker, die Fujiwara (1964) aus allerdings nur unzureichend gereinigtem R-Phycoerythrin dargestellt hat, konnten bislang nicht wieder bestätigt werden. Die zur Kontrolle für alle Rhodella-Biliproteide durchgeführte PAS-Glycoprotein-Färbung in 5 % PAA-Gelen nach Zacharius et al. (1969) verlief eindeutig negativ (Positiv-Kontrolle: Thyroglobulin).

Die Absicherung der isoelektrischen Punkte von B-Phycoerythrin I und II, C-Phycocyanin und Allophycocyanin durch die Analyse der Aminosäurezusammensetzung wird im folgenden Kapitel vorgenommen.

2.6. Quantitative Aminosäurezusammensetzung

Die quantitative Aminosäurezusammensetzung der Biliproteide von Rhodella violacea nach saurer Hydrolyse ist in Tab. 5 wiedergegeben. B-Phycoerythrin I und II, C-Phycocyanin und Allophycocyanin sind auf Grund der Analysen distinkte Proteine mit unterschiedlicher Aminosäurekomposition. Dennoch können eine Reihe von Gemeinsamkeiten festgestellt werden.

1. Der Gehalt saurer Aminosäuren überwiegt im Vergleich zu dem basischer Aminosäuren bei allen Pigmenten und kann korreliert werden mit den im sauren pH-Bereich liegenden isoelektrischen Punkten.
2. Die unpolaren, hydrophoben Aminosäuren repräsentieren bei allen Biliproteiden einen fast gleichen Anteil von ca. 50 % des Gesamtgehaltes an Aminosäuren.
3. Asparaginsäure und Alanin dominieren in der Gruppe der sauren bzw. unpolaren Aminosäuren.

Aminosäure	Rhodella violacea[1] B-PE I	B-PE II	C-PC	APC	Porphyridium cruentum B-PE[2]	Cyanidium caldarium C-PC[3]	Cyanidium caldarium APC[4]
$CysSO_3H$	2.1	2.0	1.4	1.6	1.2	0.9	1.2
Asp	10.9	13.3	11.4	9.2	11.3	11.2	9.9
Thr[5]	3.9	4.8	6.1	6.7	3.7	6.2	5.7
Ser[5]	9.8	10.0	8.1	6.4	8.5	8.1	7.8
Glu	6.3	7.6	9.4	9.6	7.6	9.7	10.1
Pro	3.4	3.7	3.0	3.3	3.1	4.0	3.3
Gly	10.0	9.4	8.1	9.9	7.5	7.5	9.5
Ala	12.1	11.0	14.9	10.6	15.8	14.6	10.9
Val	8.3	7.8	6.5	6.7	8.2	5.3	5.8
Met	0.6	0.9	0.4	1.2	2.6	2.8	2.5
Ile	5.1	3.9	4.9	6.6	4.9	4.4	6.5
Leu	7.5	7.1	8.3	9.2	7.6	8.1	8.3
Tyr	3.0	3.1	4.6	6.1	4.7	4.7	5.6
Phe	3.3	3.4	2.7	2.1	2.2	2.8	2.2
His	0.8	0.8	0.3	---	0.7	0.6	0.4
Lys	6.5	4.8	4.0	4.9	4.2	3.4	4.7
Arg	6.4	6.4	5.9	6.9	5.8	5.9	5.6
Trp	n.b.[6]	n.b.	n.b.	n.b.	0.3	n.b.	n.b.
Summe saurer AS	17.2	20.9	20.8	18.8	18.9	20.9	20.0
Summe basischer AS	13.7	12.0	10.2	11.8	10.7	9.9	10.7
Summe unpolarer AS	50.3	47.2	48.8	49.6	51.9	49.5	49.0

1 Mittelwerte nach 24 und 48 Std. Hydrolyse (% nM, bezogen auf die Gesamtmenge identifizierter Aminosäuren)

2 nach Glazer & Hixson (1977), umgerechnet

3 nach Troxler et al. (1975), umgerechnet

4 nach Brown & Troxler (1977), umgerechnet

5 Werte ermittelt durch Extrapolation auf Nullzeit der Hydrolyse

6 Tryptophan wurde nicht bestimmt (n.b.)

Tab. 5: Quantitative Aminosäurezusammensetzung der Biliproteide von Rhodella violacea im Vergleich zu Daten entsprechender Pigmenttypen, die aus anderen Rotalgen isoliert wurden.

4. In allen Biliproteiden sind mit Ausnahme von Allophycocyanin, dem Histidin fehlt, die gleichen Aminosäuren vorhanden.
5. Von den basischen Aminosäuren stellt Histidin den geringsten Anteil.

Die unterschiedlichen isoelektrischen Punkte von 4.44 für B-Phycoerythrin I und 4.32 für B-Phycoerythrin II korrespondieren mit dem höheren Anteil an sauren Aminosäuren und dem geringeren Gehalt an Lysin in B-Phycoerythrin II, wohingegen Arginin und Histidin in beiden Pigmenten in entsprechenden Quantitäten vorkommen.

Der Anteil an Alanin ist mit 15 % im C-Phycocyanin signifikant erhöht und bietet somit ein deutliches Differenzierungsmerkmal ebenso wie für Allophycocyanin der Verlust des Histidins. In den Aminosäureanalysen von Allophycocyanin aus Cyanophyceen konnte ebenfalls kein Histidin nachgewiesen werden (Gysi & Zuber, 1974; Cohen-Bazire et al., 1977), wohl aber im Allophycocyanin von Cyanidium caldarium (Brown & Troxler, 1977), einer Rotalge mit allerdings unsicherer taxonomischer Stellung (Seckbach, 1972; Fredrick, 1976; Kremer et al., 1978). Die Pigmente dieser Alge wurden dennoch für einen Vergleich ausgewählt, da außer älteren Angaben über C-Phycocyanin bei Kimmel & Smith (1958), die zudem von der Methode her problematisch erscheinen, keine Literaturdaten über die Aminosäurekomposition von C-Phycocyanin und Allophycocyanin aus Rotalgen verfügbar sind.

Die quantitativen und qualitativen Aminosäuregehalte von Phycocyanin und Allophycocyanin aus Rhodella und Cyanidium zeigen mit Ausnahme der Anteile an Methionin einen extrem hohen Grad von Homologie. Für phylogenetische Zusammenhänge erscheint zusätzlich ein Befund an Allophycocyanin aus der Cyanophycee Synechococcus Stamm 6312 bemerkenswert, das trotz serologischer Verwandtschaft seiner α - und ß-Untereinheiten mit denen von Allophycocyanin aus Cyanidium ebenfalls kein Histidin enthält (Cohen-Bazire et al., 1977).

Beide Phycocyanine aus Rhodella weisen gegenüber den Phycoerythrinen einen signifikant niedrigeren Anteil an Cysteinsäure auf, der offensichtlich korreliert ist mit dem geringeren Gehalt an Chromophoren pro Untereinheit. Nach Angaben von Glazer (1977) enthalten die Trimere $(\alpha,\beta)_3$ von Phycocyanin und Allophycocyanin 6 bzw. 9 Chromophore, die über Thioätherbrücken kovalent an das Cystein gebunden sind (Rüdiger, 1971; Chapman, 1973; Köst et al., 1975). Im nativen B-Phycoerythrin sind demgegenüber im Hexamer $(\alpha,\beta)_6$, das zusätzlich eine γ-Untereinheit enthält, über 40 Chromophore gebunden (Glazer & Hixson, 1977).

3. Biochemische, funktionelle und strukturelle Charakterisierung isolierter intakter Phycobilisomen

3.1. Absorptionsspektren

Das Absorptionsspektrum isolierter Phycobilisomen aus Rhodella violacea in Vergleich zur in vivo Absorption ganzer Zellen ist in Abb. 17 wiedergegeben. Das Spektrum intakter Phycobilisomen weist im sichtbaren Bereich aufgrund der Phycoerythrinabsorption zwei Maxima bei 544 nm und 568 nm sowie eine Schulter bei 500 nm auf. Das breite Maximum bei 624 nm sowie die ausgeprägte Schulter bei 652 nm belegen Phycocyanin und Allophycocyanin als zusätzliche Komponenten. Maxima geringerer Extinktion bei 360, 308 und 278 nm sowie eine weitere Schulter bei 284 nm prägen das Absorptionsspektrum im kurzwelligen Bereich, wobei der Peak bei 308 nm zusätzlich Phycoerythrin anzeigt. (vgl. Kap. III.2.2.) Maxima bzw. Schultern bei 435 nm und 680 nm als Hinweis auf eine Chlorophyllverunreinigung sind nicht erkennbar.

Die charakteristischen Maxima von B-Phycoerythrin und C-Phycocyanin stimmen in Position und Ausprägung mit den Biliproteidmaxima in Absorptionsspektren ganzer Zellen überein (Abb. 17), während die Ab-

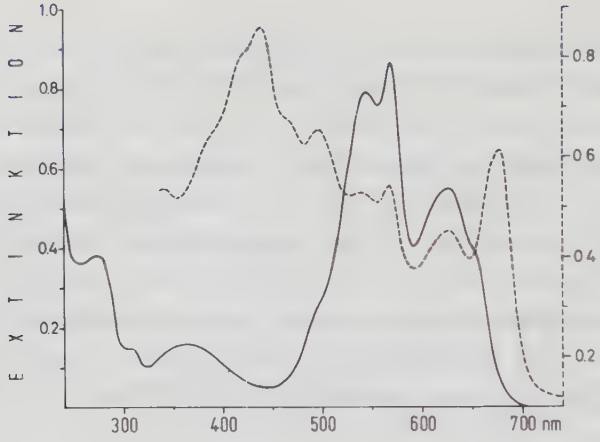

Abb. 17: Absorptionsspektrum isolierter Phycobilisomen (——) im Vergleich zur in vivo Absorption ganzer Zellen von Rhodella violacea (----). Lösungsmittel: 0.65 M Phosphatpuffer pH 7.0.

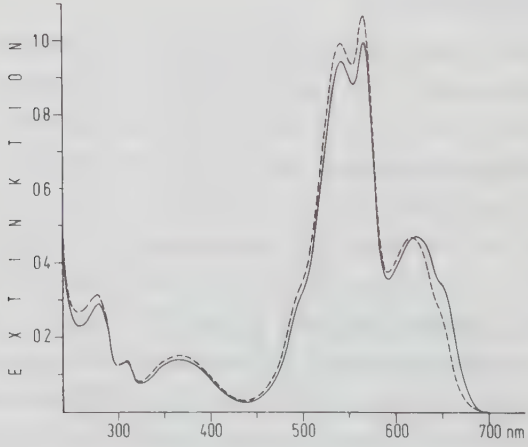

Abb. 18: Absorptionsspektrum dissoziierter Phycobilisomen (----) in 30 mM Phosphatpuffer pH 7.0 im Vergleich mit dem intakter Phycobilisomen (——) in 0.65 M Puffer. Die Proben sind auf gleiche Extinktionswerte im Phycocyanin-Maximum eingestellt.

sorption von Chlorophyll a im längerwelligen Bereich die des Allophycocyanins im in vivo Spektrum völlig überlagert.

Nach Dissoziation der Phycobilisomen verlagert sich das Phycoerythrinmaximum von 544 nach 542 nm und das des Phycocyanins von 624 nach 618 nm (Abb. 18). Die Lage der Maxima entspricht dann denen der isolierten Pigmente. Beobachtungen über die Verschiebung von Absorptionsmaxima hin zu kürzeren Wellenlängen infolge von Dissoziation sind für höhere C-Phycocyaninaggregate aus Cyanophyceen beschrieben (Lee & Berns, 1968; Vernotte, 1971; Glazer, 1977). Bemerkenswert erscheint darüberhinaus die dissoziationsbedingte Abnahme der Allophycocyaninabsorption bei 652 nm. Absorptionsspektren dissoziierter Phycobilisomen korrelieren in der Position und der relativen Höhe der Maxima mit denen wässriger Rohextrakte nach Darstellung durch $(NH_4)_2SO_4$-Fällung (Koller & Wehrmeyer, 1974).

3.2. Fluoreszenz und Energietransfer

Das Fluoreszenzemissionsspektrum intakter Phycobilisomen (Abb. 19) wird nach Anregung bei 546 nm im Bereich maximaler Phycoerythrin- aber minimaler Phycocyanin- bzw. Allophycocyanin-Absorption prinzipiell charakterisiert durch ein Hauptmaximum bei 665 - 673 nm, ein untergeordnetes Nebenmaximum bei 577 - 580 nm sowie eine breite Schulter bei 730 nm. Dabei ist die Fluoreszenz bei 577 - 580 nm offensichtlich dem B-Phycoerythrin, die im Rotbereich dem Allophycocyanin zuzuordnen, das in isoliertem Zustand bei 655 nm maximal emittiert (vgl. Kap. III. 2.2.). C-Phycocyanin hingegen zeigt eine Fluoreszenzemission bei 644 nm in intakten Dreiereinheiten (vgl. Kap. III. 4.3.).

Nach Anregung intakter Phycobilisomen bei 435 nm im Bereich minimaler Biliproteid- aber maximaler Chlorophyll-Absorption (vgl. Abb.17) verändert sich die Lage der Fluoreszenzmaxima sowie die Relation der Peakhöhen zueinander nicht (Abb. 19). Jedoch ist bei quantengleicher Anregung die Gesamtfluoreszenzausbeute drastisch auf weniger als 3 % reduziert. Darüberhinaus wird die Fluoreszenz bei 730 nm nicht mehr

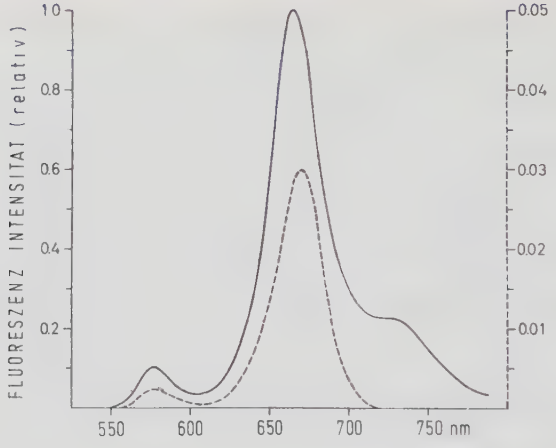

Abb. 19: Fluoreszenzemissionsspektren isolierter Phycobilisomen nach Anregung mit quantengleichem Licht von 546 nm (——) und 435 nm (----). Lösungsmittel: 0.65 M Phosphatpuffer pH 7.0. Die Spektren sind korrigiert und normiert.

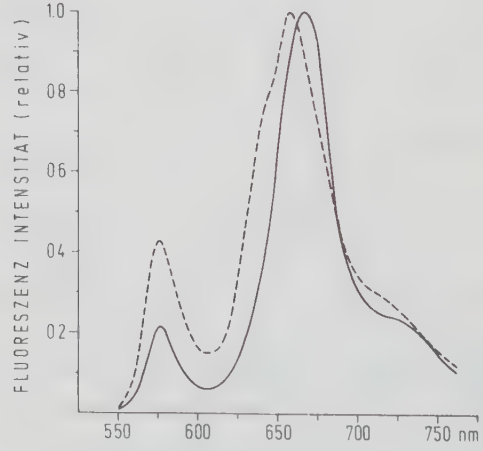

Abb. 20: Änderung der Fluoreszenzemission intakter Phycobilisomen in Abhängigkeit vom pH-Wert des Lösungsmittels, induziert durch Dialyse gegen 0.65 M Phosphatpuffer pH 5.5 (----) bzw. 8.45 (——) Anregung: 546 nm. Die Spektren sind korrigiert und normiert.

aufgelöst. Ähnliche Befunde wurden für isolierte Phycobilisomen von Porphyridium cruentum und Nostoc veröffentlich (Gantt & Lipschultz, 1973; Gray & Gantt, 1975). Diese Daten belegen in Übereinstimmung mit den Absorptionsspektren, daß augenscheinlich keine Chlorophyll- bzw. Thylakoidreste in den Phycobilisomenpräparationen vorhanden sind. Spuren von Chlorophyll a induzieren nämlich nach Anregung bei 435 nm eine starke Fluoreszenzemission bei 685 nm und 730 nm (Mohanty et al., 1972).

Die Lage der Fluoreszenzmaxima, die Relation der Peakhöhen zueinander sowie die Ausprägung der Spektren sind im Gegensatz zu den Absorptionsspektren abhängig von der Phycobilisomenkonzentration, dem pH-Wert und der Ionenkonzentration des Lösungsmittels.

Bei Gesamtbiliproteidkonzentrationen>1 mg/ml verschiebt sich das langwellige Fluoreszenzmaximum von 665 nm über 670 nm nach 673 nm (Tab. 6). Gleichzeitig verringert sich die Phycoerythrin-Fluoreszenz bis auf Ausbeuten < 2 % unter Verlagerung des Maximums von 577 nm nach 580 nm. Lokal hohe Pigmentkonzentrationen führen offensichtlich zu einer Optimierung des intermolekularen Energietransfers, wie er bei einem maximal aggregierten Zustand der einzelnen Biliproteide in vivo in den Phycobilisomen auf den Thylakoidoberflächen vorliegen dürfte.

Den Einfluß des pH-Wertes verdeutlichen Abb. 20 und Tab. 6. Abb. 20 zeigt die Fluoreszenzemissionsspektren isolierter Phycobilisomen aus 1 000 Lux Kulturen nach Dialyse gegen 0.65 M Phosphatpuffer pH 5.5 und 8.45. Obwohl in beiden Spektren das längerwellige Maximum noch dominiert, ist die Phycoerythrinfluoreszenz gegenüber dem Vergleichswert von Phycobilisomen in pH 7.0 Puffer (Abb. 20) bei gleichen Biliproteidkonzentrationen wesentlich gestiegen. Dieser Befund deutet auf eine partielle Entkopplung des Energietransfers innerhalb der Phycobilisomen hin und läßt eine Lockerung der räumlichen Anordnung der Biliproteide vermuten (siehe unten). Bei einem annähernd physiologischen pH von 7.0 scheint auf Grund der geringsten Fluoreszenzausbeute im Nebenmaximum ein optimaler Energietransfer verbunden mit einem maximalen Zusammenhalt der

Fluoreszenzdaten	KONZENTRATION (mg Biliproteid/ml; 0.65 M PP pH 7.0)				PH - WERT (0.3 mg Biliproteid/ml; 0.65 M PP)		
	0.1 - 0.5	1.0	5.0	10.0	5.5	6.2	6.3
Maxima (± 2 nm)	665 577	670 579	673 580	673 580	658 576	662 576	668 577
Schulter (± 4 nm)	735	735	735	735	720 544	720 544	725
Fluoreszenzausbeute im Nebenmaximum (Hauptmaximum = 100%)	5 - 10 %	4.5 %	2 %	1.7 %	43 %	33 %	20 %

Tab. 6: Abhängigkeit der Fluoreszenzemission intakter Phycobilisomen von der Konzentration und dem pH-Wert.

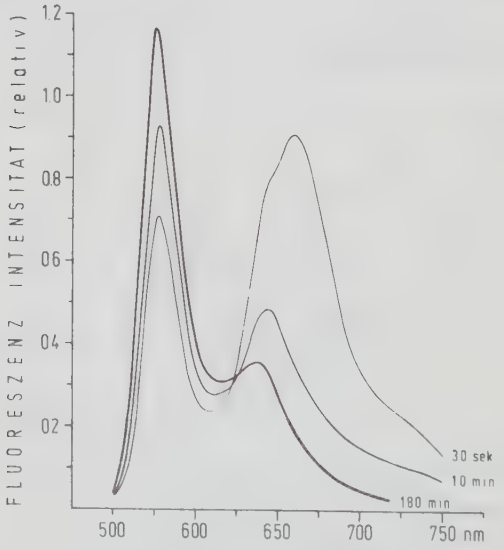

Abb. 21: Zeitabhängige Änderung der Fluoreszenzemissionsspektren dissoziierender Phycobilisomen nach Reduktion der Molarität des Lösungsmittels auf 65 mM durch Zugabe von destilliertem Wasser. Die Spektren wurden nach 30 Sek., 10 Min. und 180 Minuten aufgenommen.

Einzelpigmente gewährleistet zu sein. Bei pH 5.5 und 6.5 verlagert sich zusätzlich das Emissionsmaximum zu kürzeren Wellenlängen. Gleichzeitig tritt eine deutliche Schulter bei 644 nm auf, die offensichtlich durch die Fluoreszenz von Phycocyanin in den Dreiereinheiten bedingt ist (vgl. Kap. III. 4.3.) und als Beleg für die Existenz dieser Strukturen in den intakten Phycobilisomen gewertet werden muß.

Durch Dissoziation der Phycobilisomen nach Reduktion der Puffermolarität auf 65 mM durch Verdünnen mit destilliertem Wasser wird ein drastischer, zeitabhängiger Anstieg der Phycoerythrinfluoreszenz bei 577 nm induziert (Abb. 21). Gleichzeitig nimmt die Allophycocyanin-Emission bei 665 nm ab, verbunden mit einer Verlagerung des Maximums nach 638 nm. Im Kontrollexperiment ist nach Verdünnung einer entsprechenden Probe mit 0.65 M Phosphatpuffer zwar ein leichter Anstieg der Phycoerythrinemission zu verzeichnen, jedoch bleibt das Hauptmaximum bei 665 nm erhalten. Die Veränderung der Fluoreszenzspektren sowie die ausgeprägte Schulter bei 644 nm nach 5 - 10 Min. Dissoziation legen den Schluß nahe, daß die Dissoziation der Phycobilisomen stufenweise abläuft. Danach scheinen sich das Allophycocyanin sowie Anteile an Phycoerythrin zuerst abzulösen, während eine Reihe intakter Dreiereinheiten mit einem Emissionsmaximum bei 644 nm eine stabile Zwischenstufe bilden.

Das Fluoreszenzverhalten intakter und dissoziierter Phycobilisomen spricht für einen intermolekularen Energietransfer absorbierten Grünlichts von Phycoerythrin über Phycocyanin auf Allophycocyanin, wie er schematisch in Abb. 22 dargestellt ist. Die Zerstörung der molekularen Ordnung innerhalb der Phycobilisomen durch Dissoziation induziert eine gesteigerte Fluoreszenz des primär angeregten Donators, da die Weitergabe absorbierter Strahlungsenergie auf den folgenden Akzeptor durch die räumliche Trennung unterbunden ist. Das Maß der Phycoerythrinfluoreszenz ist somit ein Anhaltspunkt für die Entkopplung des Energietransfers und die Dissoziation der Phycobilisomen (Gantt & Lipschultz, 1973; Gantt et al., 1976).

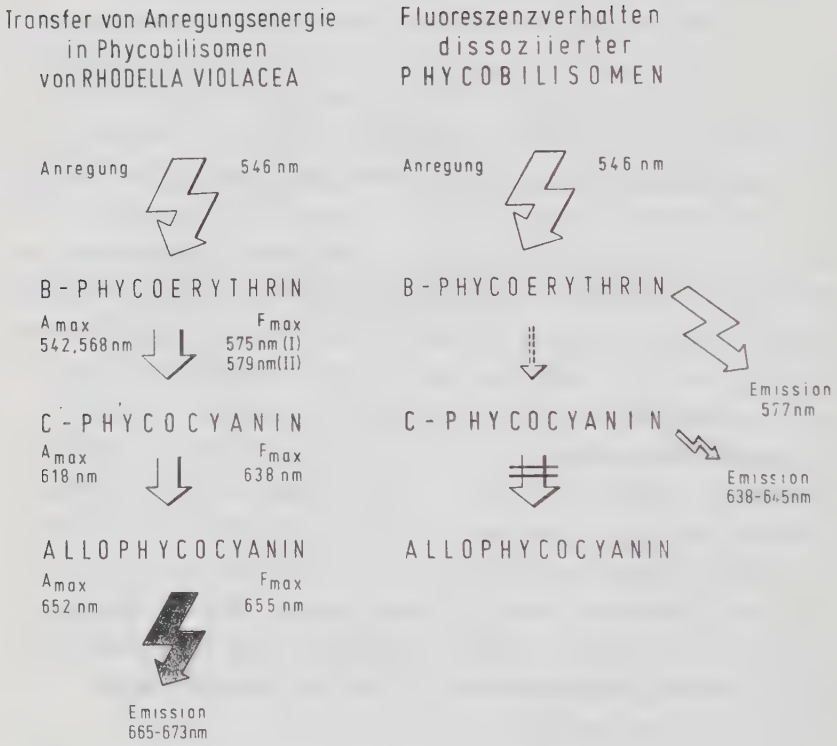

Abb. 22: Fluoreszenz und Energietransfer in intakten und dissoziierten Phycobilisomen.

3.3. Quantitativer Biliproteidgehalt

Mit der Isolierung der Einzelpigmente aus den Phycobilisomen, der Bestimmung ihrer Extinktionskoeffizienten sowie der exakten Auswertung der spektralen Überlappung der individuellen Absorptionsspektren in den jeweiligen Maxima konnten die Voraussetzungen für die Abschätzung der Pigmentgehalte in den Phycobilisomen geschaffen werden. Die Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) versagt in Gegenwart von 0.65 M Kaliumionen, da Kaliumtartrat in der Testlösung ausfällt. Um daher für alle Messungen gleiche Voraussetzungen zu schaffen, wurde jeweils 30 mM Phosphatpuffer pH 7.0 als Lösungsmittel verwendet. Der quantitative Gehalt an B-Phycoerythrin, C-Phycocyanin und Allophycocyanin in dissoziierten Phycobilisomen und Rohextrakten aus identischen, mit 1 000 Lux bestrahlten Zellsuspensionen ist in Tab. 7 dargestellt: Während sich für Phycoerythrin und Phycocyanin vergleichbare Werte ergeben, erscheint der Gehalt an Allophycocyanin in den Phycobilisomen gegenüber dem in Rohextrakten erhöht. Entsprechendes gilt für Phycobilisomen und Rohextrakte aus 3 000 Lux-Kulturen (Koller et al., 1977). Die Steigerung des Allophycocyaninanteils ist möglicherweise dadurch erklärbar, daß infolge der Detergenzbehandlung auch stark membranassoziiertes Allophycocyanin extrahiert wird.

Die Kenntnis der prozentualen Pigmentverteilung und der Molekulargewichte ermöglicht die Kalkulation der molaren Verhältnisse der einzelnen Biliproteide untereinander. Ausgehend von den Molekulargewichten der Phycoerythrine (245 000 - 280 000) und von Allophycocyanin (130 000 - 145 000) sowie den Untersuchungen an den Dreiereinheiten, in denen Phycocyanin als Aggregat mit einem Molekulargewicht von ca. 260 000 vorliegt, kann abgeleitet werden, daß B-Phycoerythrin, C-Phycocyanin und Allophycocyanin in 1 000 Lux-Phycobilisomen in einem molaren Verhältnis von ca. 2 : 1 : 1 vorkommen (vgl. dazu Kap. III. 2.3. und III. 4.6.). Die tatsächliche Anzahl der individuellen Proteinaggregate wird folglich auf Grund der Phycobilisomendimensionen sowie der Feinstrukturanalyse (Kap. III. 3.5.) ein mehrfaches dieses Verhältnisses darstellen.

Material	Biliproteidkomposition (%)		
	B-PE	C-PC	APC
Phycobilisomen (1000 Lux Kulturen)	61.4	23.1	15.5
Rohextrakte (1000 Lux Kulturen)	62.1	23.9	14.0

Tab. 7: Quantitative Biliproteidkomposition dissoziierter Phycobilisomen und wässriger Rohextrakte (± 1 %).

3.4. Variation der Biliproteidkomposition

Zur Klärung der Fage, ob die Pigmentzusammensetzung der Phycobilisomen statisch oder variabel und damit ihr molekularer Bau konstant oder veränderlich ist, wurden Anzuchten von Rhodella violacea zur Induktion von Pigmentverschiebungen unterschiedlichen Kulturbedingungen unterworfen. Nach 6-tägigem NO_3^- - Mangel z.B. macht sich in den in vivo-Spektren im Biliproteidabsorptionsbereich von 500 - 650 nm eine Reduktion der Extinktionswerte bemerkbar (Abb. 23), die auf eine Abnahme des Gesamtbiliproteidgehaltes/ml Zellsuspension hindeutet. Dies konnte durch Bestimmung der jeweiligen Biliproteidgehalte bestätigt werden (Tab. 8). Veränderungen in der Biliproteidkomposition ließen sich aus den Spektren jedoch nicht unmittelbar ableiten. Entsprechendes galt für die Auswertung der Absorptionsspektren von 3 000 Lux-Kulturen.

Erst die Analyse isolierter Phycobilisomen selbst läßt die Variation in der Pigmentkomposition erkennen, wie Tab. 8 zeigt. Demnach wird der Anteil von Phycoerythrin bei hoher Lichtintensität und besonders unter den Bedingungen des Stickstoffmangels bis zu 13 % verringert, während in beiden Fällen der Phycocyanin- und Allophycocyaningehalt in gleichem

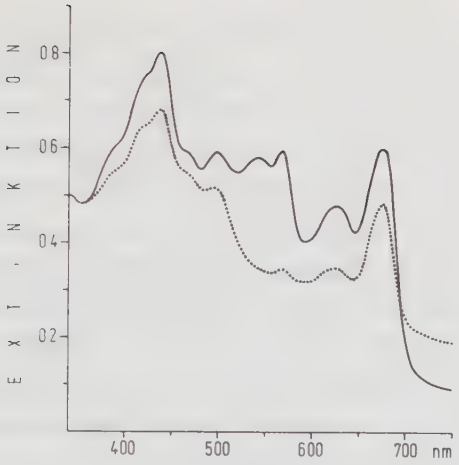

Abb. 23: Absorptionsspektren ganzer Zellen nach Anzucht bei 1 000 Lux (——) und nach 6-tägigem NO_3^- -Mangel (----). Zellzahl in den 1 000 Lux-Kulturen: 1.4 x 10^8 Zellen/ml, in den NO_3^--Mangelkulturen: 3.0 x 10^6 Zellen/ml. Referenz: 0.65 M Phosphatpuffer pH 7.0

Phycobilisomen	Biliproteidgehalt (%)			Gesamtbiliproteidgehalt (µg) in 2 x 10^6 Zellen
	B-PE	C-PC	APC	
1000 Lux Kulturen	61.4	23.1	15.5	210
3000 Lux Kulturen	57.5	24.9	17.6	180
NO_3- Mangelkulturen	48.0	29.8	22.2	65

Tab. 8: Biliproteidkomposition isolierter Phycobilisomen und Gesamtbiliproteidgehalte/Zelle nach Variation der Kulturbedingungen (± 1 %).

Maße ansteigt und somit pro Phycobilisom konstant bleibt. Dieser Effekt wird besonders deutlich in den Absorptionsspektren von Phycobilisomenpräparationen, die auf identische Extinktionswerte bei 624 nm eingestellt waren (Abb. 24). Im Absorptionsbereich von Phycocyanin und Allophycocyanin deckt sich der Kurvenverlauf der Spektren. Die Phycoerythrinabsorption hingegen ist besonders bei den Phycobilisomen aus NO_3^--Mangel-Kulturen (Mangelphycobilisomen) wesentlich reduziert und zeigt somit einen geringeren Gehalt an Phycoerythrin an.

Nach quantitativer Analyse entspricht die Abnahme der Extinktion bei 542 nm von 13 % dem Verlust von ca. 2 - 3 Phycoerythrinaggregaten (siehe Diskussion). Die so bedingte Reduktion der molaren Masse der Mangelphycobilisomen um ein Molekulargewicht von ca. 500 000 - 800 000 muß einen Einfluß auf die Sedimentationsgeschwindigkeit ausüben. Dies wird deutlich beim Vergleich der Elutionsprofile einer unter identischen Voraussetzungen durchgeführten Trennung von Mangelphycobilisomen und Phycobilisomen aus 1 000 Lux-Kulturen (Normalphycobilisomen). Demnach wandern die 'schwereren' Normalphycobilisomen in einem Saccharosedichtegradienten in der Zeiteinheit weiter als die 'leichteren' Mangelphycobilisomen (Abb. 25).

Additive bzw. selektive Rotlicht- oder Grünlichtbestrahlung der Kulturen, die bei chromatisch adaptierbaren Cyanophyceen eine verstärkte Phycocyanin- bzw. Phycoerythrinproduktion induzieren (Bogorad, 1975), hatten keinen signifikanten Einfluß auf die Pigmentierung der Phycobilisomen von Rhodella violacea. Jedoch kann der Gesamtgehalt an Biliproteiden pro Zelle durch additives Rotlicht gesteigert werden.

Eine geringere Anzahl an Phycoerythrinaggregaten pro Phycobilisom bedeutet eine Verringerung der Anzahl der primären Grünlichtakzeptoren. Daher sollten sich insbesondere bei den Mangelphycobilisomen Auswirkungen auf den Energietransfer ergeben. In Abb. 26 sind die Fluoreszenzspektren von Phycobilisomen aus 1 000 Lux- und Nitratmangelkulturen miteinander verglichen. Beide Proben waren auf identische Extinktionswerte im Phycocyaninabsorptionsmaximum eingestellt. Während die

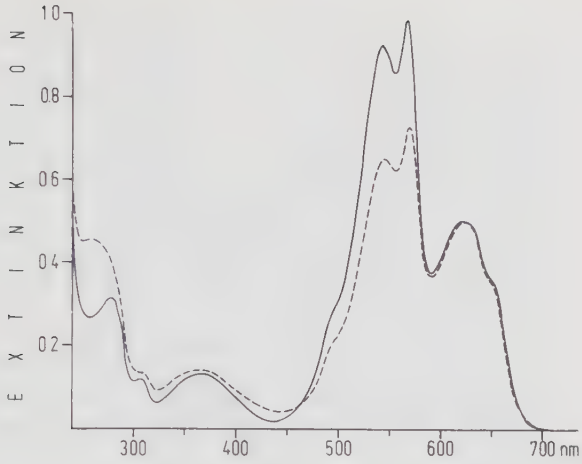

Abb. 24: Absorptionsspektren isolierter Phycobilisomen aus 1 000 Lux-Kulturen (——) und NO_3^--Mangelkulturen (----). Die Lösungen waren auf identische Extinktionswerte bei 624 nm eingestellt. Lösungsmittel: 0.65 M Phosphatpuffer pH 7.0.

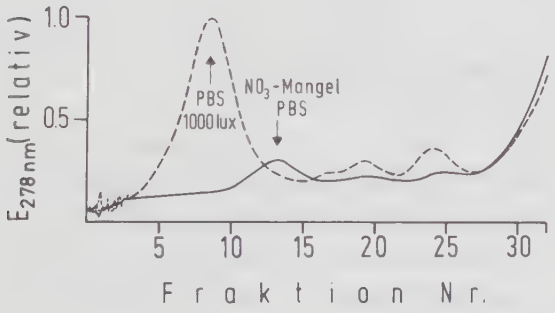

Abb. 25: Sedimentationsverhalten von Phycobilisomen aus 1 000 Lux- und NO_3^--Mangelkulturen. Die Elutionsprofile von Dichtegradienten wurden nach Ultrazentrifugation unter identischen Zentrifugationsbedingungen aufgenommen.

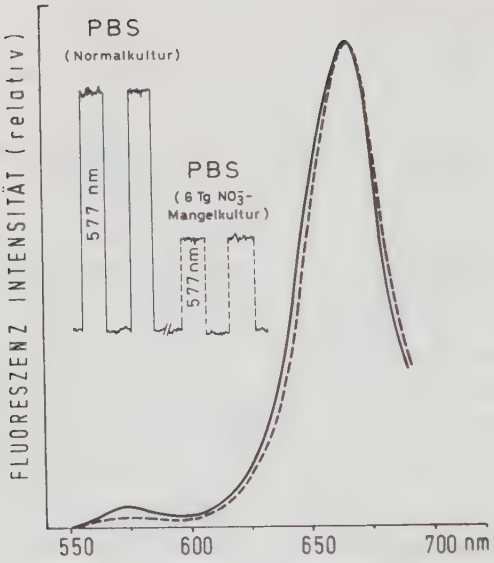

Abb. 26: Fluoreszenzemissionsspektren intakter Phycobilisomen aus 1 000 Lux-Normal- (——) NO_3^--Mangelkulturen (----) in Lösungen identischer Extinktion bei 624 nm. Das Inset gibt die Fluoreszenzausbeuten der jeweiligen Proben im Phycoerythrinemissionsmaximum an. Lösungsmittel: 0.65 M Phosphatpuffer pH 7.0. Anregung: 546 nm.

Fluoreszenzausbeute im langwelligen Bereich sowie die Lage des Hauptmaximums bei 665 nm und somit die Transferraten identisch sind, zeigen die Mangelphycobilisomen eine um 60 % reduzierte Fluoreszenzemission bei 577 nm. Dieser Befund bedeutet, daß in den Normalphycobilisomen nicht alle Phycoerythrinaggregate ihre absorbierte Strahlungsenergie an das Emissionszentrum übertragen können. In diesem Sinne ist die Funktionsfähigkeit der Phycobilisomen trotz Verlustes an Primärakzeptoren nicht beeinträchtigt.

3.5. Elektronenmikroskopische Darstellung

Die elektronenmikroskopische Aufnahme einer Phycobilisomenpräparation aus 1 000 Lux-Kulturen nach Glutaraldehydfixierung und Negativkontrastierung in Abb. 27 belegt eine weitgehend homogene Fraktion von Proteinaggregaten hoher struktureller Integrität. Da eine detaillierte Strukturanalyse der Phycobilisomen bereits vorliegt (Mörschel et al., 1977), erübrigt sich eine ausführliche Darstellung an dieser Stelle.

Den prinzipiellen Aufbau der Phycobilisomen zeigt Abb. 28. Danach bilden drei ringförmige Proteinaggregate durch seitliche Aneinanderlagerung ein dreieckiges Zentrum, um das in einem Halbkreis sechs Dreiereinheiten radial angeordnet sind. Die Dreiereinheiten selbst entstehen durch flächige Assoziation von drei Einzelscheibchen und formen so zylindrische Elemente mit einem Durchmesser von 8.7 nm und einer Höhe von 15 nm. Die Einzelscheibchen sind ca. 3.9 nm dick. Der Abstand zueinander variiert zwischen 1.2 und 1.5 nm. Die Dreiereinheiten stehen senkrecht zur Tafelebene, während die zentralen Aggregate parallel dazu verlaufen. Für die flache Basis der Phycobilisomen wurde im Mittel eine Länge von 53 nm gemessen, die größte Höhe beträgt 33 nm.

Grundsätzlich kann die elektronenmikroskopische Analyse isolierter Phycobilisomen die räumliche Anordnung von Proteinen sowie deren Anzahl aufzeigen, sie vermag jedoch nicht der jeweiligen Struktur das Einzelpigment zuzuordnen. Somit bleibt die Frage der Verteilung von Phycoerythrin, Phycocyanin und Allophycocyanin innerhalb der Phycobilisomen offen. Um diesen Fragenkomplex zu klären, mußten die Bauelemente der Phycobilisomenperipherie in Form der Dreiereinheiten intakt isoliert und biochemisch charakterisiert werden.

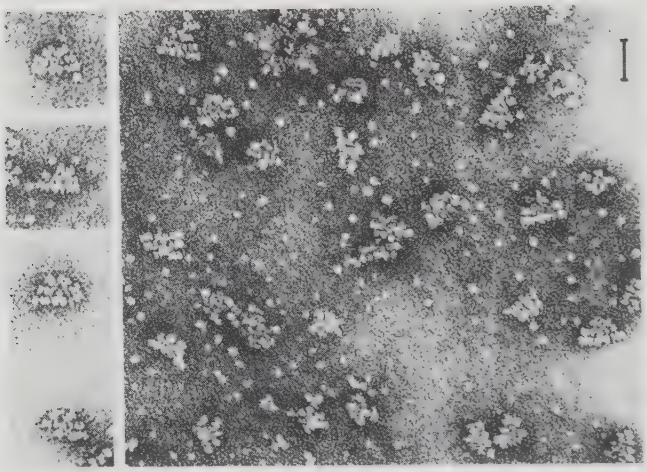

Abb. 27: Elektronenmikroskopisches Bild einer Fraktion isolierter intakter Phycobilisomen nach Glutaraldehydfixierung und Negativkontrastierung. Maßstab: 50 nm

Abb. 28: Phycobilisomenmodell nach elektronenmikroskopischer Analyse isolierter Phycobilisomen unter Berücksichtigung der molaren Biliproteidverhältnisse (Kap. III. 3.3.) und der Biliproteidkomposition der Dreiereinheiten (Kap. III. 4.5.). (Aus Mörschel et al., 1977).

4. Biochemische und funktionelle Charakterisierung intakter Dreiereinheiten

4.1. Isolationsverfahren

Die Trennung kontrolliert dissoziierter Phycobilisomen durch Ultrazentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten in Gegenwart von 0.65 M Phosphatpuffer pH 7.0, der sich bereits bei der Stabilisierung intakter Phycobilisomen bewährte, ergab vier biliproteidhaltige Banden (Abb. 29). Die Fraktionen repräsentieren dabei offensichtlich die im Assoziations-Dissoziations-Gleichgewicht stehenden Biliproteide zum Zeitpunkt des Zentrifugationsbeginns: Wird das dissozierte Phycobilisomenmaterial unmittelbar nach der Sephadex-Passage oder zwei bis vier Stunden später im Dichtegradienten getrennt, ändert sich das Bandenmuster wenig, jedoch ist der Anteil an den Fraktionen I und II wesentlich reduziert. Dagegen erscheint ein Sediment aus schweren Phycobilisomenfragmenten. Die prozentuale Verteilung der Biliproteide in den einzelnen Fraktionen nach einer typischen Präparation ist in Tab. 9 erfaßt.

Bande IV aus dem Dichtegradienten enthält auf Grund der Absorptionsspektren und gelelektrophoretischer Analyse ein Gemisch aus Phycocyanin und Allophycocyanin, Bande III dagegen überwiegend Phycoerythrin. Nach elektronenmikroskopischer Untersuchung konnten für Bande IV einzeln liegende, ringförmige Strukturen, für Bande III Einzelscheibchen nachgewiesen werden. Da die Trennung durch Zentrifugation eine Zonierung auf Grund der Molekulargewichte erwarten läßt (Martin & Ames, 1961), sollten sich in den folgenden Banden Assoziate von Biliproteiden befinden. Die rötlichblaue Fraktion II enthält nach elektronenmikroskopischer Kontrolle Einheiten aus 2 miteinander aggregierten Einzelscheibchen.

Einen Überblick über die Strukturen der Bande I, die den größten Anteil an Biliproteidmaterial pro Zentrifugenröhrchen darstellt (vgl. Abb. 29, Tab. 9), vermittelt Abb. 30.

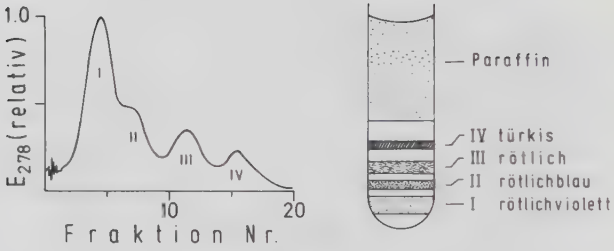

Abb. 29: Isolation der Dreiereinheiten aus partiell dissoziierten Phycobilisomen durch Dichtegradientenzentrifugation in 0.65 M Phosphatpuffer pH 7.0. Fraktion I im Dichtegradienten und Elutionsprofil enthält die Dreiereinheiten.

Fraktion Nr.	Biliproteidgehalt (%/Zentrifugenröhrchen)		
	B-PE	C-PC	APC
IV	-	19	76
III	22	5	4
II	19	16	-
I	59	58	-
Sediment	-	2	20

Tab. 9: Biliproteidzusammensetzung der einzelnen Fraktionen nach Dichtegradientenzentrifugation dissoziierter Phycobilisomen. Zur Bandenverteilung siehe Abb. 29.

Dominierend in dieser Fraktion sind feinstrukturell aus 3 Einzelscheibchen bestehende, zylindrische Komplexe, deren Dimensionen mit den Maßen der von den Phycobilisomen her bekannten Dreiereinheiten übereinstimmen und diesen daher gleichgesetzt werden müssen. Der Anteil an einzeln liegenden Scheibchen im elektronenmikroskopischen Bild ist vermutlich auf partielle Dissoziation während der Dialyse zur Reduktion der Zucker- bzw. Pufferquantitäten zurückzuführen, die zur feinstrukturellen Untersuchung im Elektronenmikroskop notwendig ist (vgl. dazu auch Kap. III. 4.6.).

4.2. Absorptionsspektren

Das Absorptionsspektrum isolierter Dreiereinheiten im Vergleich zu dem intakter Phycobilisomen ist in Abb. 31 dargestellt. Mit Ausnahme einer deutlichen Differenz in dem langwelligen Absorptionsbereich stimmen beide Spektren überein. Die Absorptionsmaxima von Phycoerythrin bei 544 und 568 nm korrespondieren in der Position und der relativen Höhe. Das Maximum der Phycocyaninabsorption verlagert sich von 624 nm in den Phycobilisomen nach 622 nm in den Dreiereinheiten, begleitet von einer Abnahme der Extinktion. Die in den Phycobilisomen ausgeprägte Schulter bei 652 nm im Bereich maximaler Allophycocyaninabsorption fehlt in den Dreiereinheiten.

4.3. Fluoreszenz und Energietransfer

Die Vermutung, daß in den Dreiereinheiten kein Allophycocyanin vorhanden ist, wurde erhärtet durch die Fluoreszenzemissionsspektren (Abb. 32). Nach Anregung von Phycoerythrin zeigen die Phycoerythrin-Phycocyaninkomplexe ein Hauptfluoreszenzmaximum bei 644 nm sowie eine Schulter bei 715 nm, die dem Phycocyanin zugeordnet werden müssen (vgl. Kap. III. 2.2.). Das Nebenmaximum bei 577 nm ist auf Phycoerythrinfluoreszenz zurückzuführen.

Abb. 30: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Fraktion isolierter Dreiereinheiten nach Glutaraldehydfixierung und Negativkontrastierung. Maßstab: 50 nm.

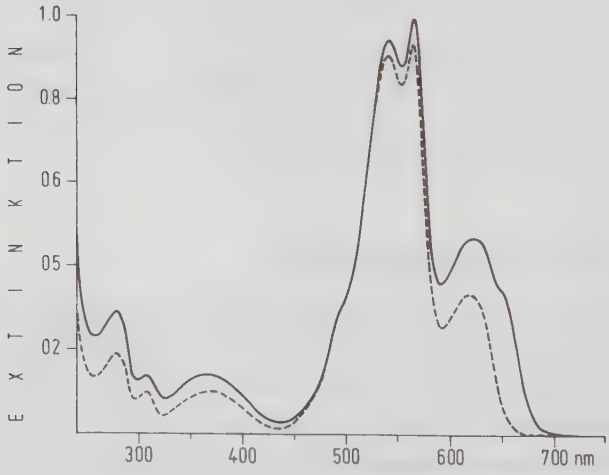

Abb. 31: Absorptionsspektren isolierter Dreiereinheiten (----) und Phycobilisomen (——) in 0.65 M Phosphatpuffer pH 7.0.

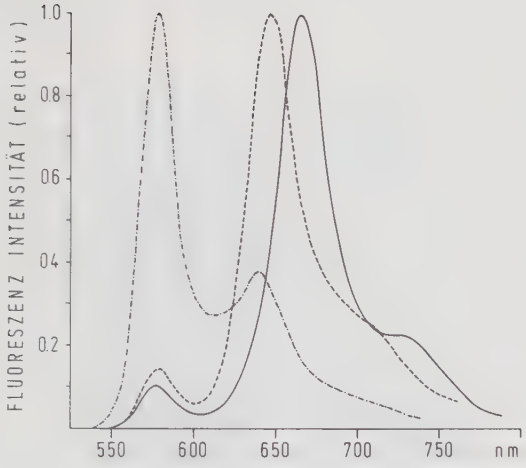

Abb. 32: Fluoreszenzemissionsspektren von intakten Dreiereinheiten (----) und Phycobilisomen (——). Lösungsmittel: 0.65 M Phosphatpuffer pH 7.0. Fluoreszenz dissoziierender Dreiereinheiten (- - -) nach 3 Std. in 65 mM Phosphatpuffer pH 7.0.

Im Gegensatz zur Fluoreszenz der Dreiereinheiten ist das Hauptmaximum sowie die Schulter bei den Phycobilisomen, die zusätzlich Allophycocyanin enthalten, um ca. 20 nm in den längerwelligen Rotbereich verschoben. Wird die Puffermolarität in einer Präparation von Dreiereinheiten durch Verdünnen mit destilliertem Wasser auf 65 mM reduziert, so dissoziieren die Komplexe. Die Unterbrechung des Energietransfers von Phycoerythrin nach Phycocyanin durch Zerstören der molekularen Ordnung führt, ähnlich wie bei den Phycobilisomen (vgl. Abb. 21), zu einem zeitabhängigen Anstieg der Phycoerythrinemission bei 577 nm. Daneben kommt es zu einem Abfall der Phycocyaninfluoreszenz, verbunden mit einer Verschiebung des Emissionsmaximums nach 638 nm (Abb. 32). Die Position des Maximums bei 638 nm entspricht exakt dem des gereinigten Phycocyanins (vgl. Kap. III. 2.2.).

4.4. Vergleich der Untereinheitenmuster von Dreiereinheiten und Phycobilisomen

Die vergleichende Analyse der Untereinheitenmuster von Dreiereinheiten und Phycobilisomen gab Aufschluß über die qualitative Verteilung von Phycoerythrin, Phycocyanin und Allophycocyanin. Unter denaturierenden Bedingungen werden in den SDS- und Harnstoffgelen die Untereinheiten von Allophycocyanin aufgelöst (Abb. 33). Während im SDS-Gel der Phycobilisomen beide Allophycocyanin-Untereinheiten deutlich hervortreten, wird eine der beiden in Harnstoffgelen durch Phycoerythrinpolypeptide maskiert. In den Dreiereinheiten sind die Untereinheiten des Allophycocyanins nicht nachweisbar. Andererseits zeigen die verbleibenden Banden von Phycoerythrin und Phycocyanin übereinstimmende Positionen und entsprechende Anfärbung. Beide Faktoren lassen auf den gleichen Gehalt an diesen Pigmenten in den Phycobilisomen und Dreiereinheiten schließen.

In den SDS-Gelen der Phycobilisomen erscheinen zwei zusätzliche, während des Laufes ungefärbte Proteine mit einem Molekulargewicht von 95 000 und 86 000, deren Wanderungsverhalten auch durch wiederholtes Erhitzen der Proben auf 100°C nicht verändert wurde.

4.5. Quantitative Pigmentzusammensetzung

Quantitäten an Phycoerythrin und Phycocyanin in den Dreiereinheiten wurden mit Hilfe der Extinktionskoeffizienten der gereinigten Pigmente abgeschätzt. Dreiereinheiten aus den Phycobilisomen von 1 000 Lux-Kulturen enthalten 71 % Phycoerythrin und 29 % Phycocyanin (Werte $\pm$ 2 %). Dieses Pigmentverhältnis ist vergleichbar mit dem 61 % : 23 %-Verhältnis in den Phycobilisomen. Daher scheint die Gesamtheit dieser Pigmente in den Dreiereinheiten lokalisiert zu sein. Berücksichtigt man ein Molekulargewicht von 265 000 - 280 000 für Phycoerythrin (vgl. Kap. III.2.3.) sowie den Befund, daß Phycocyanin *in vivo* ein Aggregat vom Molekulargewicht von ca. 260 000 darstellt (vgl. Kap. III. 4.6.), kann für Phyco-

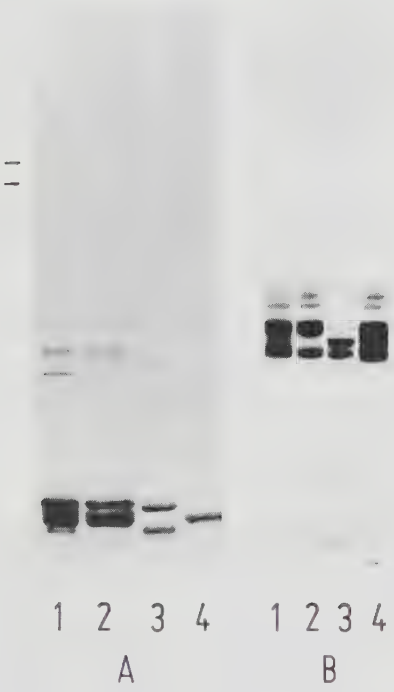

Abb. 33: Vergleich der Untereinheitenmuster von Dreiereinheiten und Phycobilisomen nach SDS-(A) und Harnstoff-Gelelektrophorese (B). Phycobilisomen (A1/B1), Dreiereinheiten (A2/B2), Allophycocyanin (A3/B3), Phycocyanin (A4), Dreiereinheiten, denen Allophycocyanin zugesetzt wurde (B4).

erythrin und Phycocyanin ein molares Verhältnis von 2 : 1 entsprechend dem in Phycobilisomen abgeleitet werden. Der leicht erhöhte Anteil an Phycoerythrin in den Präparationen der Dreiereinheiten mag darauf zurückzuführen sein, daß ein untergeordneter Prozentsatz von Partikeln der Fraktion II (siehe Abb. 34 und Tabelle 10) mit geringerem Phycocyaningehalt auch in den Präparationen der Dreiereinheiten vorhanden ist.

Verschiedene Möglichkeiten der Verteilung von Phycoerythrin und Phycocyanin entsprechend einem 2 : 1 Verhältnis erscheinen innerhalb der drei Scheibchen der Dreiereinheiten möglich. Aus funktionellen Gründen jedoch wird eine lineare Anordnung von zwei aus Phycoerythrin und einem homogen aus Phycocyanin bestehenden Scheibchen bevorzugt. Die anschließenden Cross-Linking-Experimente sollen diese These bestätigen.

4.6. Anordnung der Biliproteide in den Dreiereinheiten

Informationen über das Aggregationsschema von Phycoerythrin und Phycocyanin in den Dreiereinheiten sowie deren Molekulargewicht ergaben sich aus den Vernetzungsexperimenten und Molekulargewichtsbestimmungen mit Hilfe der PAA-Gradientengel-Elektrophorese (Abb. 34). Die für die Elektrophoresen notwendige Reduktion der Puffermolarität in den Präparationen von Dreiereinheiten sowie basische pH-Werte während der Elektrophorese fördern die Dissoziationen der Dreiereinheiten (vgl. Kap. III. 3.2. und Kap. III. 4.3.). Daher mußte ein geeigneter Weg zur Stabilisierung der Proteidaggregate gefunden werden. Die zunächst eingesetzten Vernetzer DMS und DTPP erwiesen sich als ungeeignet, weil sie für einen ausreichenden Vernetzungsgrad ebenfalls dissoziationsbeschleunigende basische pH-Bedingungen und niedrige Puffermolaritäten als Schutz gegen Selbsthydrolyse benötigen. Polylysin als weiteres Agens wird bei 0° C in niedrigen Puffermolaritäten für längere Zeit angewendet (Gordon et al., 1974) und schied somit von vornherein aufgrund der Applikationsbedingungen aus.

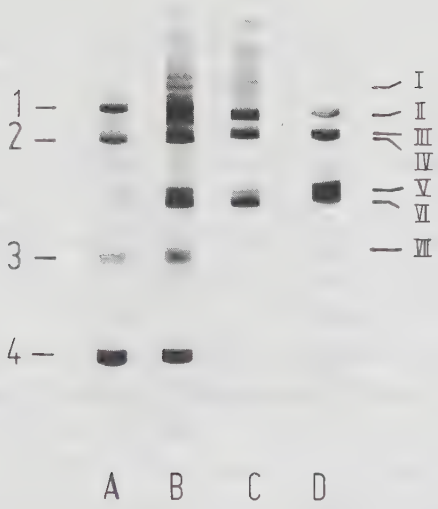

Abb. 34: Bandenverteilungsmuster von Glutaraldehyd-fixierten und anschließend partiell dissoziierten Dreiereinheiten in der Gradientengel-Elektrophorese (vgl. Kap. II. 4.5.2.). A. Referenzproteine: (1) Thyroglobulin (MG 665 000), (2) Ferritin (MG 450 000), (3) Rinderserumalbumin Dimer (MG 134 000) und Monomer (MG 67 000). B. Dreiereinheiten nach Dissoziation bei pH 5.7, zusätzlich Referenzproteine; C. wie B., jedoch ohne Referenzproteine; D. Dreiereinheiten nach Dissoziation bei pH 7.0. Zu den Eigenschaften der Spaltprodukte vgl. Tab. 10. Anode unten.

Die besten Resultate bei der Strukturerhaltung der Dreiereinheiten wurde nach Fixierung mit 0.05 % Glutaraldehyd erzielt. Konzentrationen über 1 % führten zu hochgradiger Verklumpung und Aggregatbildung. Glutaraldehyd wurde schon erfolgreich bei der Stabilisierung verschiedener Enzyme (Russell & Hopwood, 1976) sowie, in allerdings wesentlich höheren Konzentrationen, bei der Fixierung der Phycobilisomen angewandt (Gantt & Lipschultz, 1972). Auch bleibt die Fähigkeit zur Fluoreszenzemission und zum Energietransfer in biliproteidführenden Partikelfraktionen erhalten (Cohen-Bazire & Lefort-Tran, 1970; Clement-Metral & Lefort-Tran, 1971).

Um der Tendenz des Phycocyanins entgegenzuwirken, bei pH 7.0 in verdünnten Puffern in stabile Aggregate vom Molekulargewicht 140 000 zu zerfallen (vgl. Kap. III. 2.3.), wurde der pH-Wert des Dialysepuffers auf pH 5.7 eingestellt. Bei sauren pH-Werten in der Nähe des isoelektrischen Punktes nämlich wird ein höherer Aggregationsstand von C-Phycocyanin aufrecht erhalten (Hattori et al., 1965; Glazer et al., 1973; Kao & Berns, 1977).

Das Proteinmuster in der Gelelektrophorese weist verschiedene homogene und heterogene Assoziate von Phycoerythrin und Phycocyanin auf (Abb. 34, Tab. 10). Die Biliproteidbande I in Abb. 34 repräsentiert die Dreiereinheiten, die durch Rotfluoreszenz und ein Phycoerythrin zu Phycocyanin Verhältnis von 2 : 1 charakterisiert sind. Die quantitativ stärkste, rotblaue Bande II zeigt zwar ein entsprechendes Fluoreszenzverhalten, jedoch ist das Pigmentverhältnis von Phycoerythrin zu Phycocyanin mit einem Wert von 2 : 0.5 signifikant verschieden. Nach Dialyse bei pH 7.0 erscheint die entsprechende Bande gleichzeitig mit einem stärkeren Anteil an freiem Phycocyanin (Abb. 34, D VII). Dreiereinheiten sind nach Dialyse in pH 7.0-Puffern kaum erkennbar. Konsequenterweise liegt der Schluß nahe, daß das Phycocyanin in den Dreiereinheiten als Assoziat aus zwei kleineren Einheiten mit je einem Molekulargewicht von 140 000 vorliegt.

Die Molekulargewichte aller isolierbaren Banden nach Glutaraldehydfixierung und anschließender Dissoziation der Dreiereinheiten wurden

Proteinbande	Molekular-gewicht	Biliproteid-komposition	Fluoreszenz (Anr. 546 nm)	erwartetes Molekular-gewicht
I	790 000	B-PE : C-PC 2 : 1	stark rot	770 000
II	590 000	B-PE : C-PC 2 : 0.5	stark rot	630 000
III	470 000	B-PE	orange	490 000
IV	460 000	B-PE : C-PC 1 : 1	rot	505 000
V	260 000	C-PC	schwach rot	280 000
VI	245 000	B-PE	orange	
VII	140 000	C-PC	schwach rot	

Tab. 10: Eigenschaften der isolierten Biliproteidbanden nach Gradienten-Gelelektrophorese von Glutaraldehyd-vernetzten und anschließend dissoziierten Dreiereinheiten. Fluoreszenzanregung: 546 nm.

durch Gradientengel-Elektrophorese im Vergleich zu Referenzproteinen ermittelt und sind in Tab. 10 zusammengestellt. Die auftretenden Aggregationsformen sowie die pigmentanalytischen Eigenschaften stützen die Annahme einer polaren Anordnung der Biliproteide innerhalb der Dreiereinheit: Demnach stellen zwei der drei Scheibchen einer Dreiereinheit Phycoerythrinaggregate dar, an die ein Scheibchen Phycocyanin mit einem Molekulargewicht von ca. 260 000 assoziiert ist. Die aus pigmentanalytischen und Cross-Linking Experimenten abgeleitete Anordnung der Biliproteide in den Dreiereinheiten ist in einem Modell in Abb. 35 dargestellt.

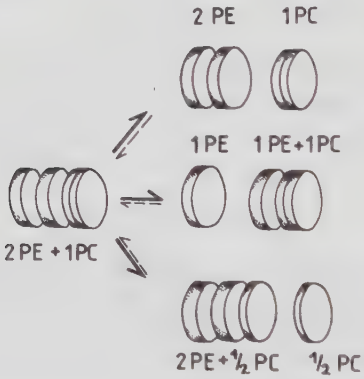

Abb. 35: Modell der Anordnung von B-Phycoerythrin und C-Phycocyanin in den Dreiereinheiten nach Analyse der Fragmente von Glutaraldehyd-vernetzten und anschließend partiell dissoziierten Dreiereinheiten.

4.7. Molekulargewicht

Das erwartete Molekulargewicht der Dreiereinheiten von 770 000 steht sowohl im Einklang mit dem experimentell ermittelten Wert von 790 000 (vgl. Tab. 10, Abb. 34) wie mit dem rein additativ, aus den Molekulargewichtsbestimmungen der gereinigten Pigmente an G-200-Sephadex abgeleiteten Molekulargewicht von 840 000 (vgl. Kap. III. 2.3.). Nach Analyse der Sedimentationsgeschwindigkeit der Dreiereinheiten in 0.65 M Phosphatpuffer in der analytischen Ultrazentrifuge konnte ein Sedimentationskoeffizient von 20 S errechnet werden, der die Größenanordnung des Molekulargewichtsbereich ebenfalls absichert.

IV. DISKUSSION UND VORSTELLUNG EINES MODELLS DER ANORDNUNG VON B-PHYCOERYTHRIN, C-PHYCOCYANIN UND ALLOPHYCOCYANIN IN DEN PHYCOBILISOMEN

Die erfolgreiche Isolierung von Phycobilisomen wurde erstmals von Gantt & Conti (1967) durchgeführt. Die Autoren behandelten Zellhomogenate von Porphyridium cruentum mit Desoxycholat in Gegenwart von 0.1 M Phosphatpuffer pH 6.8 und trennten anschließend die Partikelfraktion im Saccharose-Stufengradienten. Die von Gantt & Conti und später von Cohen-Bazire & Lefort-Tran (1970) sowie Evans & Allen (1973) vorgeschlagene Glutaraldehydfixierung vor und während der Fragmentierung der Zellen erwies sich jedoch als ungeeignete Methode. Die Fixierung führte zur irreversiblen Assoziation von Biliproteiden und chlorophyllltragenden Thylakoidmembranen, wobei nach erfolgter Auftrennung im Dichtegradienten Phycobilisomenpräparationen resultierten, die nur unzulänglich von Chlorophyllkontaminationen zu befreien waren.

Gantt & Lipschultz (1972) verbesserten dann durch Anwendung von Triton X 100, die Einführung noch höherer Puffermolaritäten bis 0.5 M und die Änderung des Stufengradienten das Isolationsverfahren für die sphärischen Phycobilisomen von Porphyridium cruentum. Eine entsprechende Methodik wurde von Gray et al. sowie Gray & Gantt (1973; 1975) zur Darstellung der nach Wildman & Bowen (1975) offensichtlich scheibchenförmigen Phycobilisomen aus der Cyanophycee Nostoc sp. angewandt. Über die Ursachen der Erhaltung der Phycobilisomenstruktur in hohen Konzentrationen an Phosphat-Anionen geben die Autoren keine Auskunft. Von Hippel & Schleich (1969) und Ebert & Ebert (1977) diskutieren speziell einen stabilisierenden Einfluß auf hydrophobe Bedingungen.

Die erste Isolierung scheibchenförmiger Phycobilisomen aus einer Rotalge gelang Koller et al. (1977). Um dabei kontaminationsfreie Phycobilisomenfraktionen zu erhalten, wurden das Zellaufschlußverfahren und das stabilisierende Puffersystem modifiziert sowie kontinuierliche Saccharose-Dichtegradienten für die Trennung neu eingeführt.

Durch weitere Modifikation des Dichtegradienten konnte ein Schnellverfahren entwickelt werden, welches den Zeitbedarf für die Isolierung von 18 Stunden auf nur 3.5 Stunden reduziert. Da die Phycobilisomen sich in ihren Eigenschaften nach Anwendung beider Verfahren entsprechen, läßt sich der erst kürzlich von Gantt (1977) erhobene Einwand einer möglichen Lockerung der Phycobilisomenstruktur und ihr Einfluß auf die Lage des Fluoreszenzemissionsmaximums infolge längerer Zentrifugationsdauer entkräften. Für die Isolierung der wahrscheinlich scheibchenförmigen Phycobilisomen aus Nostoc wurde bei Verwendung eines Stufengradienten nahezu die doppelte Zentrifugationsdauer benötigt (Gray et al., 1973; Gray & Gantt, 1975).

Die Qualität der aus Rhodella violacea isolierten Phycobilisomen ist an den Kriterien der Reinheit, Homogenität und Integrität zu messen. Die Reinheit der Phycobilisomenfraktionen frei von Membranfragmenten, Vesikeln sowie Chlorophyll a konnte durch Elektronenmikroskopie, Absorptions- sowie Fluoreszenzspektren belegt werden. Das einheitliche Wanderungsverhalten bei der Dichtegradientenzentrifugation sowie die weitgehend gleiche Partikelform bei der elektronenmikroskopischen Analyse negativ gefärbter Phycobilisomen weisen die Homogenität der isolierten Phycobilisomen nach. Für die Integrität der Phycobilisomen sprechen mehrere Befunde:

1. Strukturell sind die Phycobilisomen nach Fixierung und Negativkontrastierung im elektronenmikroskopischen Bild sowohl in ihrer Dimension wie in ihrer Gestalt vergleichbar mit den in situ-Aggregaten in Ultradünnschnitten ganzer Zellen.
2. In biochemischer Hinsicht besteht Übereinstimmung in der qualitativen und quantitativen Pigmentkomposition von dissoziierten Phycobilisomen und Rohextrakten auch nach experimentell herbeigeführter Pigmentvariation.
3. Funktionell erfüllen intakte Phycobilisomen die Fähigkeit zu intermolekularem Transfer von Anregungsenergie vom Phycoerythrin über Phycocyanin auf Allophycocyanin, der gleichzeitig den aggregierten Zustand dieser Pigmente belegt.

Isolierte Phycobilisomen aus 1 000 Lux-Kulturen von Rhodella violacea enthalten ca. 61 % B-Phycoerythrin, 23 % C-Phycocyanin und 16 % Allophycocyanin. Damit unterscheidet sich dieser Phycobilisomentyp hinsichtlich der Pigmentkomposition und der prozentualen Anteile der einzelnen Biliproteide signifikant von den bislang bekannten Phycobilisomen. Für die Phycobilisomen aus Porphyridium cruentum ermittelten Gantt & Lipschultz (1974) eine Pigmentverteilung von 84 % Phycoerythrin, wobei B-Phycoerythrin sowie eine biochemische Variante b-Phycoerythrin zu etwa gleichen Anteilen vorkommen, 11 % R-Phycocyanin und 5 % Allophycocyanin. Ley et al. (1977) korrigierten die prozentualen Anteile auf 83 % : 8 % : 10 %, obwohl die Kulturen in gleichen Medien und unter vergleichbaren Kulturbedingungen angezogen und weitgehend entsprechende Isolationsverfahren verwendet worden waren. Weiterhin konnten die Autoren mit Allophycocyanin B einen zusätzlichen Pigmenttyp isolieren, der durch zwei Maxima bei 618 und 671 nm sowie ein Fluoreszenzmaximum bei 673 nm spektral charakterisiert ist. Der geforderte Anteil von einem Allophycocyanin B-Trimer $(\alpha, \beta)_3$ pro Phycobilisom ist jedoch rein rechnerisch nur dann zutreffend, wenn der Gesamtgehalt an Allophycocyanin bei 10 % liegt. In den weniger gut untersuchten Phycobilisomen von Nostoc konnten Gray & Gantt (1975) ein dem C-Typ vergleichbares Phycoerythrin, C-Phycocyanin sowie Allophycocyanin nachweisen. Exakte Angaben über die quantitative Pigmentverteilung fehlen jedoch. Wenngleich die Verwendung von Extinktionskoeffizienten einzelner Biliproteide aus den Literaturwerten problematisch ist (vgl. Kap. III. 2.2.), kann zumindestens die Größenordnung von Pigmentgehalten ermittelt werden. Wendet man in diesem Sinne die von Bennett & Bogorad (1973) veröffentlichten Gleichungen für die simultane Berechnung der Konzentration an den oben erwähnten Biliproteiden auf das Absorptionsspektrum der Phycobilisomen von Nostoc an, so ergibt sich ein ähnliches Pigmentverhältnis mit einem dominierenden Phycoerythrin-Anteil, wie er auch in den Rhodella Phycobilisomen vorliegt.

Nach Analyse von Pigmentdaten und Ultradünnschnitten stellten Gantt & Conti (1967) und Gantt (1975) eine Beziehung zwischen der Phycobilisomenmorphologie und dem Pigmentgehalt her. Demnach soll die Form der Phycobilisomen scheibchenförmig bei überwiegendem Phycocyanin und sphärisch gestreckt bei dominierendem Phycoerythringehalt sein. Das Phycoerythrin : Phycocyanin Verhältnis in den Phycobilisomen von Rhodella violacea beträgt 61% : 23%. Trotz der Dominanz von Phycoerythrin sind die Phycobilisomen zweifelsfrei scheibchenförmig (Wehrmeyer, 1971; Wehrmeyer & Schneider, 1975; Mörschel et. al., 1977). Da auch die Phycobilisomen von Nostoc nicht die von Gantt aufgestellte Hypothese stützen, muß zum gegenwärtigen Zeitpunkt die Frage einer Beziehung zwischen quantitativem und qualitativem Pigmentgehalt und der Phycobilisomenstruktur als nicht geklärt betrachtet werden.

Intakte Phycobilisomen von Rhodella violacea sind durch die Fähigkeit zum Transfer von Anregungsenergie charakterisiert. Dabei wird grünes Anregungslicht von 546 nm zu mehr als 80 % Phycoerythrin absorbiert, intermolekular über Phycocyanin auf Allophycocyanin übertragen und als Rotlicht emittiert. In der Zelle dagegen wird die absorbierte Anregungsenergie direkt auf Chlorophyll a weitergeleitet und unmittelbar der Photosynthese nutzbar gemacht (Duysens, 1952; French & Young, 1952; Ley & Butler, 1977; Ried et al., 1977; Porter et al., 1978). Für die mit einem wesentlich höheren Anteil an Phycoerythrin-Primärakzeptoren ausgestatteten Phycobilisomen von Porphyridium cruentum konnten Grabowski & Gantt (1978) und Searle et al., (1978) Raten für den intermolekularen Energietransfer von 94 - 98 % bzw. 99 % ermitteln. Der Wirkungsgrad der Energieübertragung auf Chlorophyll a erreicht in ganzen Zellen Werte zwischen ca. 90 % (Tomita & Rabinowitch, 1962) und 99 % (Porter et al., 1978). Nach Anregung ganzer Zellen von Rhodella violacea mit Grünlicht von 546 nm weist das Fluoreszenzemissionsspektrum im Gegensatz zu dem von Porphyridium cruentum eine Schulter bei 644 nm und ein Hauptmaximum bei 658 nm auf. Diese Emissionen müssen den Dreiereinheiten bzw. intakten Phycobilisomen zugeordnet werden.

Aus der Höhe des Emissionsmaximum der Phycobilisomen, das durch Überlagerung der Dreiereinheitenfluoreszenz um 7 - 12 nm in den kürzerwelligen Spektralbereich verschoben ist, kann abgeleitet werden, daß offensichtlich nicht alle Phycobilisomen ihre absorbierte Strahlungsenergie über Chlorophyll an die Reaktionszentren der Photosysteme weiterleiten können sondern vielmehr als Fluoreszenz emittieren. Es scheinen demnach die hohen, in der Literatur für Porphyridium cruentum angegebenen Transferraten in ganzen Zellen von Rhodella violacea nicht erreicht zu werden.

Der Energiewanderung innerhalb der Phycobilisomen soll der Mechanismus des Resonanztransfers im Sinne von Förster (1948, 1960) zu Grunde liegen (Searle et al., 1978; Grabowski & Gantt, 1978). Für diese Art der Energieübertragung müssen sich u.a. die Absorptions- und Fluoreszenzspektren von Donor- und Akzeptormolekülen überlappen (vgl. Kap. III. 2.2.) und räumliche Beziehungen bestehen. Für eine Transferrate von 50 % soll ein Abstand zweier Pigmente von 4 nm ausreichen (Arnold & Oppenheimer, 1950). In den isolierten Phycobilisomen von Rhodella violacea wurde eine Distanz zwischen den Einzelscheibchen von 1.2 - 1.5 nm gemessen. Die Fluoreszenzemission isolierter Dreiereinheiten bei 644 nm bestätigt einen Energietransfer vom Phycoerythrin auf Phycocyanin. Damit ist zunächst eine intermolekulare Energieübertragung innerhalb der beiden Phycoerythrin-Aggregate auf der Basis absorbierender und fluoreszierender Chromophore einer Chromophorspezies wahrscheinlich (Teale & Dale, 1970), an die sich der Transfer auf Phycocyanin anschließt.

Das Fluoreszenzemissionsmaximum intakter Phycobilisomen von Rhodella violacea mit Allophycocyanin als terminalem Emitter liegt abhängig von der Konzentration im Bereich von 665 - 673 nm, wohingegen isoliertes Allophycocyanin bei 655 nm maximal fluoresziert. Gantt & Lipschultz (1973) und Gray & Gantt (1975) publizierten Maxima bei 675 nm und 670 nm für die Phycobilisomen von Porphyridium cruentum und Nostoc sp.. Das gereinigte Allophycocyanin aus diesen Organismen fluoresziert bei 660 nm bzw. 659 nm. Die Autoren erklären die Verschiebung der Maxima in den

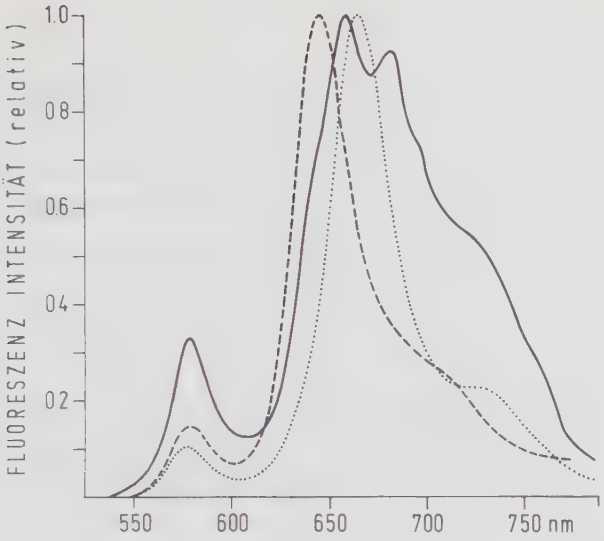

Abb. 36: Fluoreszenzspektren ganzer Zellen (——), Phycobilisomen (·····) und Dreiereinheiten (----) nach Anregung bei 546 nm. Die Spektren sind korrigiert und auf die jeweiligen Maxima normiert. Die Messungen erfolgten bei Zimmertemperatur. Die Zellzahl betrug 8 x 10^6 Zellen/ml.

längerwelligen Rotbereich als Folge der Aggregation von Allophycocyanin innerhalb der Phycobilisomen (Zilinskas et al., 1978). Entsprechende, aggregationsbedingte Fluoreszenzänderungen für C-Phycocyanin zeigte bereits Vernotte (1971). Demgegenüber führen Ley et al., (1977) die Lage des Emissionsmaximums der Phycobilisomen auf die Gegenwart von Allophycocyanin B zurück, welches in isoliertem Zustand als Trimer bei 673 nm maximal fluoresziert. In den Phycobilisomen von Rhodella konnte bislang kein Allophycocyanin B nachgewiesen werden, während der aggregierte Zustand von Allophycocyanin im Phycobilisomenzentrum (siehe Phycobilisomenmodell) nachhaltig belegt ist. Die eigenen

Untersuchungen stützen daher die von der Arbeitsgruppe um Gantt aufgestellte Hypothese.

Die Existenz von Dreiereinheiten als native, definierte Strukturen der Phycobilisomen wurde bislang von anderen Autoren nicht hinreichend beachtet, obwohl sie in elektronenmikroskopischen Bildern der sphärischen Phycobilisomen von Porphyridium cruentum und in frisch präparierten Rohextrakten aus der Cyanophycee Calothrix parietina nachweisbar sind. (Gantt & Lipschultz, 1972; Kessel et al., 1973). Obwohl die Dreiereinheiten demnach bisher nur in drei Algenarten nachgewiesen wurden, erscheint es denkbar, daß es sich um eine weiter verbreitete Biliproteid-Aggregationsform in Phycobilisomen mit wahrscheinlich variabler Pigmentzusammensetzung handelt. Die Dreiereinheiten aus den Rhodella-Phycobilisomen erwiesen sich als heterogene Biliproteidkomplexe aus B-Phycoerythrin und C-Phycocyanin. Die Gegenwart von Allophycocyanin konnte definitiv auf Grund der biochemischen und funktionellen Untersuchungen ausgeschlossen werden.

Der native Charakter der Isolate wird durch mehrere Befunde gestützt:

1. Die Feinstruktur und Dimensionen der Dreiereinheiten nach Isolation und in den Phycobilisomen stimmen überein.
2. Das Phycoerythrin : Phycocyanin Verhältnis in den Dreiereinheiten von 2 : 1 entspricht dem Verhältnis dieser Pigmente in den Phycobilisomen.
3. Artifizielle Re-Aggregation von Biliproteiden in vitro führte zwar zu hochgeordneten und aus scheibchenförmigen Einheiten zusammengesetzten Kristallen, jedoch nicht zu definierten Strukturen mit einer konstant begrenzten Anzahl von Einzelscheibchen (Eiserling & Glazer, 1974; Bryant et al., 1976).
4. Heterogene Aggregate mit einem stöchiometrischen Biliproteidverhältnis konnten bislang durch Kristallisationsexperimente nicht dargestellt werden. Gemische aus Phycoerythrin und Phycocyanin führten nicht zu Mischkristallen (Bryant et al., 1976).

Andererseits sind höhere Aggregationsformen von B-Phycoerythrin und C-Phycocyanin bis hin zu Spezies mit Sedimentationskoeffizienten von 19, 22 und 27 S belegt (Gantt, 1969; Lee & Berns, 1968; MacColl et al., 1971a). Für beide Pigmente konnte darüberhinaus eine scheibchen- bzw. ringförmige Struktur in negativ gefärbten Präparaten elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden (Berns & Edwards, 1965; Gantt, 1969; Mörschel, 1978).

Wegen des gleichen molaren Verhältnisses von B-Phycoerythrin und C-Phycocyanin in Dreiereinheiten und Phycobilisomen muß die Gesamtheit dieser beiden Pigmente in den Dreiereinheiten lokalisiert sein. Dabei repräsentieren zwei der Scheibchen einer Dreiereinheit B-Phycoerythrin, an das polar ein Scheibchen aus Phycocyanin aggregiert ist, das selbst aus zwei kleineren trimeren Einheiten besteht. Die Existenz hexamerer C-Phycocyanin-Aggregate vom Molekulargewicht 260 000 wird von O'Carra & O'h Eocha (1976) bestätigt. Nach Auswertung von Densitogrammen dissoziierter, gelelektrophoretisch getrennter Dreiereinheiten liegen B-Phycoerythrin I und II in einem gleichen quantitativen Verhältnis vor. Daher scheint es denkbar, daß ein Scheibchen der Dreiereinheiten B-Phycoerythrin I, das zweite B-Phycoerythrin II darstellt. Ebenso können natürlich Dreiereinheiten-Spezies jeweils nur eines der beiden Phycoerythrine enthalten.

Aus der Aufklärung der Biliproteidzusammensetzung in den Dreiereinheiten folgt, daß Allophycocyanin in den scheibchenförmigen Strukturen des Phycobilisomenzentrums lokalisiert ist. Die molaren Pigmentverhältnisse der individuellen Biliproteide zueinander sowie die Anzahl der Dreiereinheiten pro Phycobilisom ermöglichen die Kalkulation des gesamten Biliproteidbestandes: Ein Phycobilisom von Rhodella violacea enthält nach Anzucht der Algen bei 1 000 Lux 12 B-Phycoerythrin, 6 C-Phycocyanin und 6 Allophycocyanin-Aggregate mit Molekulargewichten von jeweils 260 000 - 280 000, 260 000 respektive 130 000 - 145 000. Die Anordnung dieser Biliproteide innerhalb des Phycobilisoms ist in einem Modell in Abb. 37 wiedergegeben, das die pigmentanalytischen,

Abb. 37: Modell der Anordnung von B-Phycoerythrin, C-Phycocyanin und Allophycocyanin in den scheibchenförmigen Phycobilisomen von Rhodella violacea. Zwei der peripheren Scheibchen einer Dreiereinheit stellen Phycoerythrin-Aggregate dar, die über Phycocyanin mit dem zentral gelegenen Allophycocyanin in Verbindung stehen.

funktionellen und feinstrukturellen Befunde an Dreiereinheiten und isolierten Phycobilisomen zusammenfaßt. Danach ist die Phycobilisomenperipherie durch Phycoerythrin besetzt, das über Phycocyanin als Brückenglied mit dem Allophycocyanin des Phycobilisomenzentrums in Verbindung steht. Bei einer angenommenen peripheren Anordnung von Phycocyanin, die aufgrund der Analyse der Dreiereinheiten möglich wäre, beträgt die Distanz zum Allophycocyanin mehr als 10 nm, was eine Energieübertragung durch Resonanztransfer ausschließen würde (Arnold & Oppenheimer, 1950; Förster, 1960). Da in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen nur drei ringförmige Aggregate in Phycobilisomenzentrum sichtbar, nach den pigmentanalytischen Daten aber sechs Allophycocyanin-Aggregate vorhanden sind, muß das Allophycocyanin ähnlich wie Phycocyanin in hexamerer Aggregationsform mit Doppelscheibchenstruktur vorliegen.

Auf der Basis des Pigmentbestandes eines Phycobilisoms und der ermittelten Molekulargewichte kann ein Gesamtmolekulargewicht für das scheibchenförmige Phycobilisom von Rhodella violacea von 5.5 - 6 x 10^6 abgeschätzt werden. Die sphärisch länglichen Phycobilisomen von Porphyridium cruentum übertreffen diesen Wert wesentlich. Nach Gantt et al. (1976) sowie Gantt (1975) kann ein Phycobilisom dieses Typs 70 - 80 Biliproteidaggregate vom Molekulargewicht bis zu 280 000 enthalten. Daraus würde ein Gesamtmolekulargewicht von 19 - 23 x 10^6 resultieren. Die Differenz in der molaren Masse der beiden Phycobilisomentypen zeigt sich besonders in dem unterschiedlichen Sedimentationsverhalten. Phycobilisomen von Porphyridium sedimentieren bei 80 000 x g innerhalb von 90 Minuten in einem Stufengradienten von 0.25 M - 2.0 M Saccharose, während die Phycobilisomen von Rhodella bei 120 000 x g in einem kontinuierlichen Gradienten von 0.2 - 0.75 M Saccharose erst in ca. 15 Stunden eine ähnlich weite Strecke zurücklegen.

Die Variabilität des Biliproteidgehaltes einer Zelle infolge chromatischer Adaptation ist nachhaltig belegt (Bogorad, 1975), ihre Auswirkung auf die Pigmentzusammensetzung der Phycobilisomen dagegen ungeklärt. Da Rhodella violacea nach Anzucht in Grünlicht bzw. Rotlicht

keine signifikanten Pigmentveränderungen zeigt, wurden die Kulturen zur Induktion von Pigmentverschiebungen Starklicht bzw. NO_3^--Mangelbedingungen unterworfen. Für diese sind bei Rotalgen nachhaltige Wirkungen auf den Pigmenthaushalt belegt (Brody & Emerson, 1959; Waaland et al., 1974; Wehrmeyer & Schneider, 1975). Nach Gantt (1975) sind die Phycobilisomen von Porphyridium cruentum bei Anzucht der Algen unter hohen Lichtintensitäten hinsichtlich ihrer Größe und dem Gehalt an einzelnen Biliproteiden nicht veränderbar. Jedoch nimmt die Anzahl der Phycobilisomen pro Thylakoidfläche ab. Im Gegensatz dazu bemerkten Searle et al. (1978) für die gleichen Phycobilisomen eine Veränderung des Phycocyanin: Allophycocyanin-Verhältnisses bei konstant bleibendem Phycoerythringehalt in Abhängigkeit vom Alter der Kultur. Die eigenen Untersuchungen an Starklichtkulturen und besonders an NO_3^--Mangelkulturen bestätigten zunächst den Befund der Verminderung der Phycobilisomenquantität pro Zelle. Darüber hinaus wird aber auch die Anzahl der Pigmente innerhalb eines Phycobilisoms verändert. Während der Anteil an Phycocyanin und Allophycocyanin und somit das Phycobilisomenzentrum unbeeinflußt bleibt, ist die Menge an Phycoerythrin ohne Funktionsverlust offensichtlich variabel. Der Verlust von 2 - 3 der 12 Phycoerythrinaggregate in den Mangelphycobilisomen bewirkt nur eine Reduktion der Fluoreszenzausbeute bei 577 nm um ca. 60 %. Daraus ist zu folgern, daß in den Normalphycobilisomen offenbar ein Phycoerythrinüberschuß herrscht, und daß nicht alle Phycoerythrinaggregate in diesem Phycobilisomentyp ihre absorbierte Strahlungsenergie im Rahmen des Energietransfers ableiten können. Dieser Befund wird gestützt durch das ebenfalls vorhandene Emissionsmaximum bei 577 nm in ganzen Zellen (Abb. 36).

Kürzlich konnten Tandeau de Marsac & Cohen-Bazire (1977) in SDS-Gelen ungefärbte Proteine als Bestandteile von Phycobilisomen verschiedener chromatisch adaptierbarer Cyanophyceen nachweisen. Nach Ansicht der Autoren sollen diese Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 70 000 - 120 000 eine Funktion bei der Anheftung der Phycobilisomen an die Thylakoidmembranen übernehmen. In dem SDS-Gel-Muster

der Phycobilisomen von Rhodella treten ebenfalls zwei offensichtlich ungefärbte Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 95 000 und 86 000 auf. Diese zusätzlichen Banden sind weder den Dreiereinheiten noch dem gereinigten Allophycocyanin zuzuordnen. Daher ist es höchst wahrscheinlich, daß sie mit dem kompletten Allophycocyaninzentrum intakter Phycobilisomen assoziiert sind. Hier könnten sie eine Funktion als "Kontaktproteine" bei der Phycocyanin-Allophycocyanin-Bindung erfüllen oder zur Stabilisierung des Zentrums dienen.

Nahezu unbekannt sind die intermolekularen Bindungen, welche die Positionen der einzelnen Biliproteide innerhalb eines Phycobilisoms fixieren. Der überwiegende Gehalt an hydrophoben Aminosäuren in allen Biliproteiden, die Stabilität der Phycobilisomen in hochmolaren Phosphatpuffern und die Labilität gegenüber der Reduktion der Puffermolarität, die leichte Denaturierbarkeit der Biliproteide in konzentrierten Harnstofflösungen sowie die Renaturierbarkeit z.B. von Phycocyanin nach Entfernung des Harnstoffs deuten auf einen hohen Anteil an hydrophoben Bindungen innerhalb des Phycobilisoms hin. (Nemethy, 1967; Ebert & Ebert, 1977; Glazer & Fang, 1973). Da die isoelektrischen Punkte der Biliproteide im sauren pH-Bereich liegen, sind freie Carboxylgruppen bei annähernd physiologischem pH von 7.0 - 7.5 in der Plastide deprotoniert. Es könnten somit ionische Bindungen zu protonierten basischen Aminosäuren zusätzlich eine Rolle spielen. Intermolekulare Bindungen durch zweiwertige Kationen sind ebenso wie kovalente Bindungen über S - S-Brücken wenig wahrscheinlich, da die Stabilität der Phycobilisomen durch EDTA und Reduktionsmittel nicht beeinträchtigt wird.

Scheibchenförmige Phycobilisomen sind für alle bislang untersuchten Cyanophyceen sowie für eine Anzahl von Rhodophyceen nachgewiesen (Wildman & Bowen, 1974; Wehrmeyer, 1971; Lichtle, 1978) und scheinen einen ursprünglichen Bautyp darzustellen. Die Kenntnis der Anordnung von Phycoerythrin, Phycocyanin und Allophycocyanin in den Phycobilisomen von Rhodella violacea kann daher ein genereller Anknüpfungspunkt sein für Untersuchungen, um die Ursachen und den Modus des gerichteten

"assembly" der einzelnen Biliproteide zu klären. Daneben sind Studien über die Bindung der Phycobilisomen an die Thylakoidmembranen naheliegend, die Beiträge leisten könnten zum Verständnis der streng reihigen Anordnung der Phycobilisomen sowie ihrer räumlichen Beziehungen zum Photosyntheseapparat.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Aus Triton X 100 bzw. Nonidet P 40 behandelten Zellhomogenaten der einzelligen Rotalge Rhodella violacea wurden durch präparative Ultrazentrifugation in Saccharosedichtegradienten in Gegenwart von 0.65 M K-Na-Phosphatpuffer pH 7.0 intakte Phycobilisomen präparativ dargestellt. Die minimale Zentrifugationsdauer beträgt 3.5 Stunden.

2. Die Absorptionsspektren isolierter Phycobilisomen zeigen mit Maxima bei 544, 568 und 624 nm sowie einer Schulter bei 652 nm eine Biliproteidzusammensetzung von B-Phycoerythrin, C-Phycocyanin und Allophycocyanin an. Diese Pigmente wurden aus isolierten und nachfolgend dissoziierten Phycobilisomen rein dargestellt und durch ihre Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren, Extinktionskoeffizienten, Molekulargewichte, Untereinheitenstruktur, isoelektrischen Punkte sowie ihre Aminosäurekompositionen eingehend charakterisiert.

3. Isolierte Phycobilisomen aus 1 000 Lux-Kulturen enthalten ca. 61 % B-Phycoerythrin, 23 % C-Phycocyanin und 16 % Allophycocyanin, was unter Berücksichtigung der Molekulargewichte von 245 000 - 280 000, 260 000 bzw. 130 000 - 145 000 einem molaren Verhältnis von ca. 2 : 1 : 1 entspricht. Da die Biliproteidgehalte in Phycobilisomen und Rohextrakten übereinstimmen, scheint die Gesamtheit der Biliproteide einer Zelle in den Phycobilisomen lokalisiert zu sein. Chlorophyll ist nicht nachweisbar.

4. Nach Anregung im Absorptionsbereich von Phycoerythrin bei 546 nm fluoreszieren intakte Phycobilisomen in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Konzentration mit einem Hauptmaximum zwischen 665 und 673 nm und einem phycoerythrinabhängigen Nebenmaximum zwischen 577 und 580 nm. Die Fluoreszenzausbeute im Nebenmaximum liegt zwischen 1.7 und 10 %. Die mit der Dissoziation der Phycobilisomen verbundene Zerstörung der molekularen Ordnung führt zu einem so-

fortigen Anstieg der Phycoerythrin-Fluoreszenz und einem Abfall der Rotfluoreszenz. Diese Befunde belegen für intakte Phycobilisomen einen intermolekularen Energietransfer vom Phycoerythrin als primären Akzeptor über Phycocyanin auf Allophycocyanin als terminalem Emitter.

5. Aus partiell dissoziierten Phycobilisomen wurden mit den Dreiereinheiten die strukturell definierten Bausteine der Phycobilisomenperipherie (Mörschel et al., 1977) isoliert. Intakte Dreiereinheiten bestehen aus 71 % B-Phycoerythrin und 29 % C-Phycocyanin. Das molare Verhältnis beider Pigmente beträgt ca. 2 : 1. Auf Grund der Absorptions- und Fluoreszenzspektren sowie vergleichender Untereinheitenanalyse konnte Allophycocyanin als Bestandteil der Dreiereinheiten ausgeschlossen werden.

6. Nach Anregung von Phycoerythrin bei 546 nm liegt das Maximum der Fluoreszenzemission von intakten Dreiereinheiten bei 644 nm. Der intermolekulare Transfer von Anregungsenergie vom Phycoerythrin auf Phycocyanin belegt funktionell in Übereinstimmung mit elektronenmikroskopischen Befunden die strukturelle Integrität der isolierten Dreiereinheiten.

7. Durch Vernetzung isolierter Dreiereinheiten mit Glutaraldehyd, anschließender partieller Dissoziation und Analyse der Fragmente nach Gradientengel-Elektrophorese konnte die Anordnung der Biliproteide in den Dreiereinheiten erschlossen werden. Demnach repräsentieren zwei Scheibchen einer Dreiereinheit Phycoerythrin, an die polar ein Scheibchen Phycocyanin assoziiert ist, das selbst aus 2 kleineren Aggregaten vom Molekulargewicht ca. 140 000 besteht.

8. Auf Grund der molaren Verhältnisse der Biliproteide in den Phycobilisomen sowie der Pigmentkomposition und der Anzahl der Dreiereinheiten ergibt sich ein Biliproteidbestand von 12 B-Phycoerythrin-, 6 Phycocyanin- und 6 Allophycocyanin-Aggregaten pro

Phycobilisom, wobei die Gesamtheit von Allophycocyanin in den scheibchenförmigen Strukturen des Phycobilisomenzentrums lokalisiert sein muß. Das Molekulargewicht der scheibchenförmigen Phycobilisomen von Rhodella violacea beträgt demnach 5.5 - 6 x 10^6.

9. Aus den pigmentanalytischen, funktionellen und strukturellen Befunden an Phycobilisomen und Dreiereinheiten läßt sich ein Modell der Verteilung der einzelnen Biliproteide innerhalb des Phycobilisoms entwickeln. Danach ist die Phycobilisomenperipherie durch Phycoerythrin besetzt, das über Phycocyanin mit dem Allophycocyanin im Phycobilisomenzentrum in Verbindung steht.

10. Mit dem intakten Allophycocyaninzentrum sind 2 ungefärbte Proteine vom Molekulargewicht ca. 95 000 und 86 000 assoziiert, deren Funktion mit der Stabilisierung der Phycocyanin-Allophycocyanin bzw. Allophycocyanin-Allophycocyanin Bindung in Zusammenhang gebracht wird.

11. Hohe Lichtintensitäten und 6-tägiger NO_3^--Mangel führen zu einer Reduktion des gesamten Biliproteidgehalts einer Zelle. In den Phycobilisomen wird darüber hinaus die Anzahl der Phycoerythrinaggregate verringert, während der Anteil an Phycocyanin und Allophycocyanin konstant bleibt. Durch den Verlust von 2 - 3 Primärakzeptoren pro Phycobilisom wird weder die Fähigkeit zum intermolekularen Energietransfer beeinträchtigt noch vermindert sich die funktionelle Leistung, gemessen an der Fluoreszenzausbeute im Hauptmaximum bei 665 - 673 nm.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

AIZAWA, S., KURIMOTO, F. & YOKONO, O.: Crosslinking studies with different length dithiobisalkylimidates. I. Solubilized erythrocyte spectrin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 75, 870 - 877 (1977)

ANDREWS, P.: Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gelfiltration. Biochem. J. 91, 222 - 233 (1964)

ANDREWS, P.: The gelfiltration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. Biochem. J. 96, 595 - 606 (1965)

ARNOLD, M. & OPPENHEIMER, J.R.: Internal conversion in the photosynthetic mechanism of blue-green algae. J. Gen. Physiol. 33, 423 - 435 (1950)

BENNETT, A. & BOGORAD, L.: Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. J. Cell Biol. 58, 419 - 435 (1973)

BERDEN, J.A. & VOORN-BROUWER, M.M.: Studies on the ATPase complex from beef-heart mitochondria. Isolation and characterization of an oligomycin-sensitive and an oligomycin-insensitive ATPase complex from beef-heart mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 501, 424 - 439 (1978)

BERNS, D.S. & EDWARDS M.R.: Electron micrographic investigations of C-phycocyanin. Arch. Biochem. Biophys. 110, 511 - 516 (1965)

BINDER, A., WILSON, K. & ZUBER, H.: C-Phycocyanin from the thermophilic blue-green alga Mastigocladus laminosus. Isolation, characterization and subunit composition. FEBS Letters 20, 111 - 116 (1972)

BOARDMAN, N.K., FRANCKI, R.I.B. & WILDMAN, S.G.: Protein synthesis by cell-free extracts of Tobacco leaves. III. Comparison of physical properties and protein synthesizing activities of 70 S chloroplast and 80 S cytoplasmic ribosomes. J. Mol. Biol. 17, 470 - 489 (1966)

BOGORAD, L.: Phycobiliproteins and complementary chromatic adaptation. Ann. Rev. Plant Physiol. 26, 369 - 401 (1975)

BRODY, M. & EMERSON, R.: The effect of wavelength and intensity of light on the proportion of pigments in Porphyridium cruentum. Am. J. Bot. 46, 433 - 440 (1959)

BRODY, M. & VATTER, A.E.: Observations on the cellular structures of Porphyridium cruentum. J. Biophys. Biochem. Cytol. 5, 289 - 292 (1959)

BROWN, A.S. & TROXLER, R.F.: Properties and N-terminal sequence of allophycocyanin from the unicellular rhodophyte Cyanidium caldarium. Biochem. J. 163, 517 - 581 (1977)

BRYANT, D.A., GLAZER, A.N. & EISERLING, F.A.: Characterization and structural properties of the major biliproteins of Anabaena sp.. Arch. Microbiol. 110, 61 - 75 (1976)

BRYANT, D.A., HIXSON, C.S. & GLAZER, A.N.: Structural studies on phycobiliproteins. III. Comparison of bilin-containing peptides from the ß-subunits of C-phycocyanin, R-phycocyanin and phycoerythrocyanin. J. Biol. Chem. 253, 220 - 225 (1978)

CHAPMAN, D.J.: Biliproteins and bile pigments. In: Botanical monographs (Carr, N.G. & Whitton, B.A., Eds.), pp. 162 - 185. Oxford-London-Edinburgh-Melbourne: Blackwell 1973

CHUA, N.-H. & BENNOUN, P.: Thylakoid membrane polypeptides of Chlamydomonas reinhardtii: wild-type and mutant strains deficient in photosystem II reaction center. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2175 - 2179 (1975)

CLEMENT-METRAL, J.D. & LEFORT-TRAN, M.: Fluorescence transfer in glutaraldehyde fixed particles of the red alga Porphyridium cruentum. FEBS Letters 12, 225 - 228 (1971)

COHEN-BAZIRE, E., BEGUIN, S., RIMON, S., GLAZER, A.N. & BROWN, D.M.: Physico-chemical and immunological properties of allophycocyanins Arch. Microbiol. 111, 225 - 238 (1977)

COHEN-BAZIRE, G. & LEFORT-TRAN, M.: Fixation of phycobiliproteins to photosynthetic membranes by glutaraldehyde. Arch. Mikrobiol. 71, 245 - 257 (1970)

DAVIES, G.E. & STARK, G.R.: Use of dimethyl suberimidate, a cross-linking reagent, in studying the subunit structure of oligomeric proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66, 651 - 656 (1970)

DELINCEE, H. & RADOLA, B.J.: Anomalous behaviour of horseradish peroxidase in isoelectric focusing. In: Electrofocusing and Isotachophoresis (Radola, B.J. & Graesslin, D., Eds.), pp. 181 - 188. Berlin: Walter de Gruyter 1977

DETERMANN, H.: Gelchromatographie. Berlin: Springer 1967

DUYSENS, L.N.M.: The transfer of exitation energy in photosynthesis. Dissertation. Utrecht 1952

EBERT, Ch. & EBERT, G.: Ordnungsumwandlungen von basischen Poly - α - Aminosäuren. Colloid & Polymer Sci. 255, 1041 - 1053 (1977)

EISERLING, F.A. & GLAZER, A.N.: Blue-green algal proteins: assembly forms of C-phycocyanin from Synechococcus sp. J. Ultrastruct. Res. 47, 16 - 25 (1974)

EVANS, E.L. & ALLEN, M.M.: Phycobilisomes in Anacystis nidulans. J. Bacteriol. 113, 403 - 408 (1973)

FÖRSTER, T.: Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. Ann. Physik 2, 55 - 75 (1948)

FÖRSTER, T.: Transfer mechanisms of electronic excitation energy. Rad. Res. Suppl. 2, 326 - 339 (1960)

FREDRICK, J.F.: Cyanidium caldarium as a bridge between cyanophyceae and rhodophyceae: evidence from immunodiffusion studies. Plant Cell Physiol. 17, 317 - 322 (1976)

FREDRIKSON, S.: On the temperature dependence of isoelectric points of proteins with special reference to isoelectric focusing. In: Electrofocusing and Isotachophoresis (Radola, B.J. & Graesslin, D., Eds.), pp. 71 - 83. Berlin: Walter de Gruyter 1977

FRENCH, C.S. & YOUNG, V.K.: The fluorescence spectra of red algae and the transfer of energy from phycoerythrin to phycocyanin and chlorophyll, J. Gen. Physiol. 35, 873 - 890 (1952)

FUJIWARA, T.: Sugar components of phycoerythrin in Porphyra tenera. In: Proc. IV th Int. Seaweed Symposium (De Virville, D. & Feldmann, J. Eds.), pp. 312 - 318. Oxford: Pergamon Press 1964

GANTT, E.: Properties and ultrastructure of phycoerythrin from Porphyridium cruentum. Plant Physiol. 44, 1629 - 1638 (1969)

GANTT, E.: Phycobilisomes: Light-harvesting pigment complexes. Bioscience 25, 781 - 788 (1975)

GANTT, E.: Recent contributions in biliproteins and phycobilisomes. Photochem. Photobiol. 26, 685 - 689 (1977)

GANTT, E. & CONTI, S.F.: Phycobiliprotein localization in algae. Brookhaven Symp. Biol. 19, 393 - 405 (1967)

GANTT, E., EDWARDS, M.R. & CONTI, S.F.: Ultrastructure of Porphyridium aerugineum a blue-green colored rhodophytan. J. Phycol. 4, 65 - 71 (1968)

GANTT, E., EDWARDS, M.R. & PROVASOLI, L.: Chloroplast structure of the cryptophyceae. Evidence for phycobiliproteins within intrathylakoidal spaces. J. Cell Biol. 48, 280 - 290 (1971)

GANTT, E. & LIPSCHULTZ, C.A.: Phycobilisomes of Porphyridium cruentum I. Isolation. J. Cell Biol. 54, 313 - 324 (1972)

GANTT, E. & LIPSCHULTZ, C.A.: Energy transfer in phycobilisomes from phycoerythrin to allophycocyanin. Biochim. biophys. Acta 292, 858 - 861 (1973)

GANTT, E. & LIPSCHULTZ, C.A.: Phycobilisomes of Porphyridium cruentum: pigment analysis. Biochemistry 13, 2960 - 2966 (1974)

GANTT, E. & LIPSCHULTZ, C.A.: Probing phycobilisome structure by immuno-electron microscopy. J. Phycol. 13, 185 - 192 (1977)

GANTT, E., LIPSCHULTZ, C.A. & ZILINSKAS, E.: Further evidence for a phycobilisome model from selective dissociation, fluorescence emission, immunoprecipitation, and electron microscopy. Biochim. Biophys. Acta 430, 375 - 388 (1976)

GIRAUD, G.: La structure, les pigments et les characteristiques fonctionelles de l'appareil photosynthetique de diverses algues. Physiol. Veget. 1, 203 - 255 (1963)

GLAZER, A.N.: Phycocyanins: Structure and function. In: Photochemical and Photobiological Reviews (Smith, K.C., Ed.), Vol. 1, pp. 71 - 115. New York: Plenum Publishing Corp. 1976

GLAZER, A.N.: Structure and molecular organization of the photosynthetic accessory pigments of cyanobacteria and red algae. Mol. Cell. Biochem. 18, 125 - 140 (1977)

GLAZER, A.N. & BRYANT, D.A.: Allophycocyanin B (λ_{max} 671, 618 nm). A new cyanobacterial phycobiliprotein. Arch. Microbiol. 104, 15 - 22 (1975)

GLAZER, A.N. & FANG, S.: Chromophore content of blue-green algal phycobiliproteins. J. Biol. Chem. 248, 659 - 662 (1973 a)

GLAZER, A.N. & FANG, S.: Formation of hybrid proteins from the α and ß subunits of phycocyanins of unicellular and filamentous blue-green algae. J. Biol. Chem. 248, 663 - 671 (1973 b)

GLAZER, A.N., FANG, S. & BROWN, D.M.: Spectroscopic properties of C-phycocyanin and its α and ß subunits. J. Biol. Chem. 248, 5679 - 5685 (1973)

GLAZER, A.N. & HIXSON, C.S.: Subunit structure and chromophore composition of rhodophytan phycoerythrins. J. Biol. Chem. 252, 32 - 42 (1977)

GORDON, C.N., SHIKITA, M. & HALL, P.F.: The use of a novel cross-linking procedure demonstrating the subunit structure of an oligomeric protein by negative staining. J. Ultrastruct. Res. 47, 285 - 295 (1974)

GRABOWSKI, J. & GANTT, E.: Excitation energy migration in phycobilisomes: comparison of experimental results and theoretical predictions. Photochem. Photobiol. 28, 47 - 54 (1978)

GRAY, B.H. & GANTT, E.: Spectral properties of phycobilisomes and phycobiliproteins from the blue-green alga Nostoc sp. Photochem. Photobiol. 21, 121 - 128 (1975)

GRAY, B.H., LIPSCHULTZ, C.A. & GANTT, E.: Phycobilisomes from a blue-green alga Nostoc species. J. Bacteriol. 116, 471 - 478 (1973)

GYSI, J. & ZUBER, H.: Isolation and characterization of allophycocyanin II from the thermophilic blue-green alga Mastigocladus laminosus Cohn. FEBS Letters 48, 209 - 213 (1974)

BIG, W. & BERNS, D.S.: Isoelectric focusing of C-phycocyanin. Fed. Proc. 31, 863 Abs (1973)

ALLDAL, P.: The photosynthetic apparatus of microalgae and its adaption to environmental factors. In: Photobiology of Microorganisms (Halldal, P., Ed.), pp. 17 - 55. London-New York-Sidney-Toronto: Wiley Interscience 1970

ATTORI, A., CRESPI, H.L. & KATZ, J.J.: Association and dissociation of phycocyanin and the effects of deuterium substitution on the process. Biochemistry 4, 1225 - 1238 (1965)

ATTORI, A. & FUJITA, Y.: Crystalline phycobilin chromoproteids obtained from a blue-green alga Tolypothrix tenuis. J. Biochem. (Tokyo) 46, 633 - 644 (1959)

AXO, F.T.: The wavelength dependence of photosynthesis and the role of accessory pigments. In: Comparative Biochemistry of Photoreactive Systems (Allen, M.B., Ed.), pp. 339 - 360. New York - London: Academic Press 1960

AXO, F.T. & O'h EOCHA, C.: Chromoproteins of algae. In: Handbuch der Pflanzenphysiologie (Ruhland, W., Ed.), Vol. 5/1, pp. 467 - 510. Springer: Berlin 1960

IPPEL, P.H. v. & SCHLEICH, T.: The effects of neutral salts on the structure and conformational stability of macromolecules in solution. In: Structure and Stability of Biological Macromolecules (Timasheff, S.-N. & Fasman, G.D., Eds.), pp. 417 - 575. New York: Marcel Dekker 1969

IRS, C.H.W.: Reduction and carboxymethylation of proteins. In: Methods in Enzymology (Colowick, S.P. & Kaplan, N.O., Eds.), Vol. 11, pp. 199 - 203. New York - London: Academic Press 1967

JERTEN, S., JERSTEDT, S. & TISELIUS, A.: Some aspects of the use of "continuous" and discontinuous" buffer systems in polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 11, 219 - 223 (1965)

ONES, R.F., SPEER, H.L. & KURY, W.: Studies on the growth of the red alga Porphyridium cruentum. Physiol. Plant. 16, 636 - 643 (1963)

KAO, O.H.W. & BERNS, D.S.: Similar C-phycocyanins from two strains of thermotolerant cyanophyte Mastigocladus laminosus. Can. J. Microbiol. 23, 510 - 518 (1977)

KAO, O., BERNS, D.S. & TOWN, W.R.: The characterization of C-phycocyanin from an extremely halo-tolerant blue-green alga, Coccochloris elabens. Biochem. J. 131, 39 - 50 (1973)

KESSEL, M., MACCOLL, R. BERNS, D.S. & EDWARDS, M.R.: Electron microscope and physical chemical characterization of C-phycocyanin from fresh extracts of two blue-green algae. Can. J. Microbiol. 19, 831 - 836 (1973)

KIMMEL, J.R. & SMITH, E.L.: The amino acid composition of cristalline pumpkin seed globulin, edestin, C-phycocyanin und R-phycoerythrin. Bull. Soc. Chim. Biol. 40, 2049 - 2065 (1958)

KOCH, P.: Disc-Elektrophorese: Ein Photometerzusatz zur Auswertung von Gelsäulen. Zeiss-Mitteilungen 4, 397 - 403 (1968)

KOENIG, R., STEGEMANN, H., FRANCKSEN, H. & PAUL, H.L.: Protein subunits in the potato virus X group. Determination of the molecular weights by polyacrylamide electrophoresis. Biochim. Biophys. Acta 207, 174 - 180 (1970)

KÖST, H.P., RÜDIGER, W. & CHAPMAN, D.J.: Über die Bindungen zwischen Chromophor und Protein in Biliproteiden. I. Abbauversuche und Spektraluntersuchungen an Biliproteiden. Liebigs Ann. Chem. 1582 - 1593 (1975)

KOLLER, K.P. & WEHRMEYER, W.: Isolierung und Charakterisierung der Biliproteide von Rhodella violacea (Bangiophycidae). Arch. Mikrobiol. 100, 253 - 270 (1974)

KOLLER, K.P. & WEHRMEYER, W.: B-phycoerythrin from Rhodella violacea. Characterization of two isoproteins. Arch. Microbiol. 104, 255 - 261 (1975)

KOLLER, K.P., WEHRMEYER, W. & SCHNEIDER, H.: Isolation and characterizatio of disc-shaped phycobilisomes from the red alga Rhodella violacea. Arch. Microbiol. 112, 61 - 67 (1977)

KOPPERSCHLÄGER, G., DIEZEL, W., BIERWAGEN, B. HOFMANN, E.: Molekulargewichtsbestimmungen durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter Verwendung eines linearen Gelgradienten. FEBS Letters 5, 221 - 224 (1969)

KREMER, B.P., FEIGE, G.B. & SCHNEIDER, H.A.W.: A new proposal for the systematic position of Cyanidium caldarium. Naturwissenschaften 65, 157 (1978)

KUHL, A. & LORENZEN, H.: Handling and culturing of Chlorella. In: Methods of Cell Physiology (Prescott, D.M., Ed.), Vol. 1, pp. 159 - 187. Academic Press: New York, London 1964

LARKUM, A.W.D. & WEIHRAUCH, S.K.: Photosynthetic action spectra and light harvesting in Griffithsia monilis (rhodophyta). Photochem. Photobiol. 25, 65 - 72 (1977)

LEE, J.J. & BERNS, D.S.: Protein aggregation. Studies of larger aggregates of C-phycocyanin. Biochem. J. 110, 457 - 464 (1968)

LEY, A.C. & BUTLER, W.L.: Energy transfer from photosystem II to photosystem I in Porphyridium cruentum. Biochim. Biophys. Acta 462, 290 - 294 (1977)

LEY, A.C., BUTLER, W.L., BRYANT, D.A. & GLAZER, A.N.: Isolation and function of allophycocyanin B of Porphyridium cruentum. Plant Physiol. 59, 974 - 980 (1977)

LICHTLE, C.: Etude experimentale d'une cryptophycee analyse particulière de l'appareil photosynthétique comparaison avec quelques rhodophycees. Dissertation. Paris: Université Pierre et Marie Curie 1978

LORENTZ, K.: A simple polyacrylamid gradient preparation for estimating molecular weights. Anal. Biochem. 76, 214 - 220 (1976)

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, L.A. & RANDALL, R.J.: Protein measurement with the FOLIN phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)

MACCOLL, R., BERNS, D.S. & GIBBONS, O.: Characterization of cryptomonad phycoerythrin and phycocyanin. Arch. Biochem. Biophys. 177, 265 - 275 (1976)

MACCOLL, R., BERNS, D.S. & KOVEN, N.L.: Effect of salts on C-phycocyanin. Arch. Biochem. Biophys. 146, 477 - 482 (1971 a)

MACCOLL, R., LEE, J.J. & BERNS, D.S.: Protein aggregation in C-phycocyanin. Studies at very low concentrations with the photoelectric scanner of the ultracentrifuge. Biochem. J. 122, 421 - 426 (1971 b)

MAIZEL, J.V.: Polyacrylamide gel electrophoresis of viral proteins. In: Methods in Virology (Maramorosch, K. & Coprowski, H., Eds.), Vol. 5, pp. 180 - 246. New York: Academic Press 1971

MARTIN, R.G. & AMES, B.N.: A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: application to protein mixtures. J. Biol. Chem. 236, 1372 - 1379 (1961)

MAURER, H.R.: Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis. Berlin-New York: Walter de Gruyter 1971

MÖRSCHEL, E.: Biochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Biliproteidaggregaten von Cryptophyceen und Rhodophyceen. Dissertation. Marburg: Philipps-Universität 1978

MÖRSCHEL, E., KOLLER, K.P., WEHRMEYER, W. & SCHNEIDER, H.: Biliprotein assembly in the disc-shaped phycobilisomes of Rhodella violacea. I. Electron microscopy of phycobilisomes in situ and analysis of their architecture after isolation and negative staining. Cytobiologie 16, 118 - 129 (1977)

MÖRSCHEL, E. & WEHRMEYER, W.: Multiple forms of phycoerythrin-545 from Cryptomonas maculata. Arch. Microbiol. 113, 83 - 89 (1977)

MOHANTY, R., BRAUN, B.Z., GOVINDJEE & THORNBER, J.P.: Chlorophyll fluorescence characteristics of system I chlorophyll a-protein complex and system II particles at room and liquid nitrogen temperature. Plant Cell Physiol. 13, 81 - 91 (1972)

MOORE, S. & STEIN, W.H.: Chromatographic determination of amino acids by use of automatic recording equipment. In: Methods in Enzymology (Colowick, S.P. & Kaplan, N.O., Eds.), Vol. 6, pp. 819 - 831. New York: Academic Press 1963

MURAKAMI, S. & PACKER, L.: The role of cations in the organization of chloroplast membranes. Arch. Biochem. Biophys. 146, 337 - 347 (1971)

NEMETHY, G.: Hydrophobe Wechselwirkungen. Angew. Chem. 79, 260 - 271 (1967)

NERMUT, M.V.: Methods of negative staining. In: Methodensammlung der Elektronenmikroskopie (Schimmel, G. & Vogell, W. Eds), Abschn.: 3.1.2.3. Stuttgart: Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft 1973

NEVILLE, D.M.: Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. J. Biol. Chem. 246, 6328 - 6334 (1971)

NOLAN, D.N. & O'h EOCHA, C.: Determination of molecular weights of algal biliproteins by gelfiltration. Biochem. J. 103, 39 p (1967)

O'CARRA, P. & O'h EOCHA, C.: Algal biliproteins and phycobilins. In: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments (Goodwin, T.W., Ed.), Vol. 1, pp. 328 - 376. New York: Academic Press 1976

O'h EOCHA, C.: Comparative biochemical studies of the phycobilins. Arch. Biochem. Biophys. 73, 207 - 219 (1958)

PANYIM, S. & CHALKLEY, R.: High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. Arch. Biochem. Biophys. 130, 337 - 346 (1969)

PARTHIER, B.: Ribosomen und das System der Proteinsynthese. In: Biochemische Cytologie der Pflanzenzelle (Jakobi, G., Ed.), pp. 41 - 71. Stuttgart: Thieme 1974

POOLE, T., LEACH, B.S. & FISH, W.W.: Analysis of polypeptide molecular weights by electrophoresis in urea. Anal. Biochem. 60, 596 - 607 (1974)

PORTER, G., TREDWELL, C.J., SEARLE, G.F.W. & BARBER, J.: Picosecond time-resolved energy transfer in Porphyridium cruentum. Part I. In the intact alga. Biochim. Biophys. Acta 501, 232 - 245 (1978)

PRATT, L.H.: Molecular properties of phytochrome. Photochem. Photobiol. 27, 81 - 105 (1978)

RADOLA, B.J. Isoelectric focusing in layers of granulated gels. II. Preparative isoelectric focusing. Biochim. Biophys. Acta 386, 181 - 195 (1974)

REISNER, A.H., NEMES, P. & BUCHOLTZ, C.: The use of coomassie brilliant blue G 250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 64, 509 - 516 (1975)

RIED, A., HESSENBERG, B., METZLER, H. & ZIEGLER, R.: Distribution of excitation energy among photosystem I and photosystem II in red algae: action spectra of light reactions I and II. Biochim. Biophys. Acta 459, 175 - 186 (1977)

RÜDIGER, W.: Gallenfarbstoffe und Biliproteide. In: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe (Herz, W., Grisebach, H. & Kirby, G.W. Eds.), Vol. 29, pp. 60 - 139. Wien-New York: Springer 1971

RUSSELL, A.D. & HOPWOOD, D.: The biological uses and importance of glutaraldehyde. In: Progress in Medical Chemistry (Ellis, G.P. & West, G.B., Eds.), Vol. 13, pp. 271 - 301. Amsterdam: North Holland Publ. Company 1976

SEARLE, G.F.W., BARBER, J., PORTER, G. & TREDWELL, C.J.: Picosecond time-resolved energy transfer in Porphyridium cruentum. Part II. In the isolated light harvesting complex (phycobilisomes). Biochim. Biophys. Acta 501, 246 - 256 (1978)

SECKBACH, J.: On the fine structure of the acidophilic hot-spring alga Cyanidium caldarium: a taxonomic approach. Microbios 5, 133 - 142 (1972)

STEGEMANN, H.: Apparatur zur thermokonstanten Elektrophorese oder Fokussierung und ihre Zusatzteile. Z. Analyt. Chem. 261, 388 - 391 (1972)

STEGEMANN, H., FRANCKSEN, H. & MACKO, V.: Potato proteins: genetic and physiological changes, evaluated by one- and two-dimensional PAA-gel-techniques. Z. Naturforsch. 28c, 722 - 732 (1973)

STUDIER, F.W.: Analysis of bacteriophage T 7 early RNAs and proteins on slab gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 79, 237 - 248 (1973)

SÜSS, K.-H., SCHMIDT, O. & MACHOLD, O.: The action of proteolytic enzymes on chloroplast thylakoid membranes. Biochim. Biophys. Acta 448, 103 - 113 (1976)

TANDEAU de MARSAC, N. & COHEN-BAZIRE, G.: Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1635 - 1639 (1977)

TEALE, F.W.J. & DALE, R.E.: Isolation and spectral characterization of phycobiliproteins. Biochem. J. 116, 161 - 169 (1970)

THORNBER, J.P.: Chlorophyll-proteins: light-harvesting and reaction center components of plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 26, 127 - 158 (1975)

TOMITA, G. & RABINOWITCH, E.: Excitation energy transfer between pigments in photosynthetic cells. Biophys. J. 2, 483 - 499 (1962)

TROXLER, R.F., FOSTER, J.A. BROWN, A.S. & FRANZBLAU, C.F.: The α and ß subunits of Cyanidium caldarium phycocyanin: properties and amino acid sequences at the amino terminus. Biochemistry 14, 268 - 274 (1975)

URBACH, W., RUPP, W. & STURM, H.: Experimente zur Stoffwechselphysiologie der Pflanzen. Teil 1. Selbstverlag: Botanisches Institut I der Universität Würzburg 1972

VERNOTTE, C.: Séparation et charactérisation spectroscopique du monomère et des polymères de la C-phycocyanine. Photochem. Photobiol. 14, 163 - 173 (1971)

VESTERBERG, O.: Staining of protein zones after isoelectric focusing in polyacrylamide gels. Biochim. Biophys. Acta 243, 345 - 348 (1971)

WAALAND, J.R., WAALAND, S.D. & BATES, G.: Chloroplast structure and pigment composition in the red alga Griffithsia pacifica: regulation by light intensity. J. Phycol. 10, 193 - 199 (1974)

WEBER, K., PRINGLE, J.R. & OSBORN, M.: Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. In: Methods in Enzymology (Hirs, C.W.H. & Timasheff, S.N., Eds.), Vol. 26, pp. 3 - 27. New York-London: Academic Press 1972

WEHRMEYER, W.: Elektronenmikroskopische Untersuchung zur Feinstruktur von Porphyridium violaceum (Kornmann) mit Bemerkungen über seine taxonomische Stellung. Arch. Mikrobiol. 75, 121 - 139 (1971)

WEHRMEYER, W. & SCHNEIDER, H.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur reversiblen Veränderung der Chloroplastenfeinstruktur von Rhodella violacea bei Stickstoffmangel. Biochem. Physiol. Pflanzen 168, 519 - 532 (1975)

WILDMAN, R.B. & BOWEN, C.C.: Phycobilisomes in blue-green algae. J. Bacteriol. 117, 866 - 881 (1974)

WINTER, A., PERLMUTTER, H. & DAVIES, H.: Preparative flat-bed electrofocusing in a granulated gel with the LKB 2117 Multiphor. LKB Application Note 198 (1975)

WRIGLEY, C.: Gel electrofocusing - a technique for analyzing multiple protein samples by isoelectric focusing. Sci. Tools 15, 17 - 23 (1968)

ZACHARIUS, R.M., ZELL, T.E., MORRISON, J.H. & WOODLOCK, J.J.: Glycoprotein staining following electrophoresis on polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 30, 148 - 152 (1969)

ZILINSKAS, B.A., ZIMMERMANN, B.K. & GANTT, E.: Allophycocyanin forms isolated from Nostoc sp. phycobilisomes. Photochem. Photobiol. 27, 587 - 595 (1978)

Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. W. Wehrmeyer, möchte ich herzlich danken für die anregenden Gespräche, die stete Diskussionsbereitschaft und Aufgeschlossenheit.

Zu Dank bin ich all denen verpflichtet, die mir ihre apparative Ausrüstung zur Verfügung stellten oder in deren Labors ich Untersuchungen durchführen konnte:
Herrn Dr. H. Schreiber, FB Physikalische Chemie, Universität Marburg (Fluoreszenzmessungen),
Herrn Prof. Dr. H. Stegemann und Frau Hella Francksen, Abt. Biochemie, Biologische Bundesanstalt Braunschweig (Elektrophoresetechniken),
Herrn Prof. Dr. D. von Wettstein und Frau Gunilla Høyer-Hansen, Carlsberg Research Laboratory, Kopenhagen (SDS-Gradientengel-Elektrophoresetechniken),
Herrn Prof. Dr. G. Ebert und Frau Dr. Christiane Ebert, FB Physikalische Chemie, Universität Marburg (Aminosäureanalysen) sowie
Herrn Dr. T. Kranz, Behringwerke Marburg (Sedimentationskoeffizienten).

Für die hervorragende Zusammenarbeit danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, besonders Herrn E. Mörschel für die Elektronenmikroskopie, Frau Ulrike Kaufer und Frau Renate Kort für die technische Hilfe.

Die Arbeit wurde unterstützt durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft über den Sonderforschungsbereich 103 (Zellenergetik und Zelldifferenzierung). Dafür sei an dieser Stelle ebenfalls gedankt.

L e b e n s l a u f

02. 05. 1946	geb. in Wanne-Eickel als Sohn des jetzigen Stadtrats Franz Koller und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Wagner
16. 01. 1949	Geburt meiner Schwester Gudrun
01. 04. 1952	Einschulung in die ev. Goethe-Volksschule in Wanne-Eickel
1958	Wechsel zur ev. Melanchthonschule
1960	Abschluß der Volksschulausbildung, Aufnahme in das staal. Aufbaugymnasium in Recklinghausen
11. 07. 1967	Abitur
WS 1967/68	Beginn des Biologiestudiums an der Philipps-Universität Marburg
13. 04. 1970	Vordiplom
10. 01. 1974	Abschluß des Biologiestudiums an der Universität Marburg nach der Diplomhauptprüfung
seit 01. 05. 1974	Anstellung als wiss. Mitarbeiter im SFB 103 (Zelldifferenzierung und Zellenergetik, Projekt "Biochemische und feinstrukturelle Untersuchung von akzessorischen Pigmenten in Chloroplasten) am FB Biologie der Universität Marburg